

**Die Menadion katalysierte Atmung
flavinabhängiger Wasserstofftransportsysteme
der Zelle**

Ingo Georg Bulik

1976



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41555611_0045

Aus dem Institut für Physiologische Chemie und
Physikalische Biochemie
der
Universität München

Vorstand: Prof.Dr.rer.nat.Dr.med.h.c.Th.Bücher
Prof.Dr.rer.nat.M.Klingenberg
Prof.Dr.rer.nat.G.H.Zachau

Die Menadion katalysierte Atmung flavinabhängiger
Wasserstofftransportsysteme der Zelle

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und einer Hohen Medizinischen Fakultät der
Ludwig Maximilians Universität zu München

vorgelegt von
Ingo Georg Bulik

aus
Hindenburg

1975



Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:Priv.-Doz. Dr. B. Brauser

Mitberichterstatter:Prof. Dr. Th. Bücher...

Dekan:Prof. Dr. W. Spann.....

Tag der mündlichen Prüfung: ..9.3.1976.....

Herrn Professor Dr.rer.nat.,Dr.med.h.c. Bücher danke ich für die Möglichkeit, in seinem Institut an einem interessanten Forschungsprojekt beteiligt gewesen zu sein.

Mein besonderer Dank zur Durchführung dieser Arbeit gilt Herrn Privatdozent Dr.med.Brauser für die Überlassung des Themas, die zur Ausführung notwendigen Apparate und seine ebenso hilfreiche Unterstützung und Kritik.

Mein Dank gilt ferner Fräulein Catoir und Frau Benkert für ihre technische Assistenz, Herrn Dipl.Chem. Hüls-
mann für die Hilfe bei der Präparation von cytochrom b_5 .

In Dankbarkeit
meinen Eltern gewidmet

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung	1
2. Material und Methoden	3
2.1 Material	3
2.1.1 Reagenzien, Puffer, Enzyme und Enzym-Test	3
2.1.2 Proteinbestimmung	6
2.1.3 Tiermaterial	6
2.1.4 Isolierung von Rattenlebermitochondrien	7
2.1.5 Präparation von angereicherter Mitochondrien außenmembran	8
2.1.6 Präparation von Rattenlebermikrosomen	8
2.1.7 Präparation von mikrosomaler NADH-cytochrom b_5 Reduktase (EC 1.6.2.2.) und cytochrom b_5	9
2.2 Spektralphotometrische Versuchs- und Meßanordnung	13
2.2.1 Durchlichtspektrophotometrie	13
2.2.1.1 Photometrische Meßanordnung	14
2.2.2 Differenzspektren	15
2.2.3 Wellenlängeneinstellung am Rapidspektroskop	16
2.2.4 Absorptionsmaxima der mitochondrialen und mikro- somaligen Pigmente	17
2.3 Kombination von spektrophotometrischer und polarographischer Methode	18
2.3.1 Küvettenanordnung zur gleichzeitigen Photometrie und Polarographie	19
2.3.2 O_2 -Mikro-Elektrode (O_2 -Pt-Elektrode)	20
2.3.3 Eichung der Elektrode	22
2.3.4 Berechnung des O_2 -Gehaltes im Medium	23

	Seite
3. Ergebnisse	23
3.1 Nicht-enzymatische Reaktion von Menadion mit Elektronendonatoren	23
3.1.1 Ascorbat-Na	23
3.1.2 NAD(P)H	26
3.2 Menadionwirkung auf die isolierte NADH-cyt. b_5 Reduktase aus Mikrosomen	26
3.2.1 Charakterisierung des Enzyms	26
3.2.2 Atmung der b_5 -Reduktase mit den Elektronendonatoren NAD(P)H ohne cytochrom b_5 im System	27
3.2.2.1 Hemmbarkeit der NAD(P)H-Atmung	28
3.2.3 Auswertung von Spektren	28
3.2.4 Atmung der b_5 -Reduktase mit den Elektronendonatoren NAD(P)H und cytochrom b_5 im System	30
3.2.4.1 Hemmbarkeit der NADPH-Atmung	31
3.2.5 Unterschiedliches Verhalten der b_5 -Reduktase mit NADH und NADPH	32
3.2.6 H_2O_2 -Bildung bei der NAD(P)H-Veratmung	35
3.3 Wirkung von Menadion auf andere Flavinenzyme	37
3.3.1 Lipoamid-Dehydrogenase (EC 1.6.4.3)	37
3.3.2 Xanthinoxidase (EC 1.2.3.2)	39
3.3.3 Glutathionreduktase (EC 1.6.4.2)	41
3.4 Menadion als Elektronenakzeptor bei der NAD(P)H-Oxidation durch Mikrosomen	45
3.5 Wirkung von Menadion auf Mitochondrien	50
3.5.1 Allgemeines	50
3.5.1.1 Kopplung der Mitochondrien	50
3.5.1.2 Hemmbarkeit der Atmung mit Dicumarol	50
3.5.2 Mitochondrien in state 1 ohne exogenes NAD(P)H	50

3.5.3	Mitochondrien in state 1 mit exogenem NAD(P)H	51
3.5.3.1	Unterschiedliches Verhalten mit NAD(P)H	51
3.5.3.2	Hemmbarkeit der NADPH-Atmung	55
3.5.4	angereicherte Mitochondrien-Außenmembran	55
3.5.4.1	NAD(P)H-Veratmung	55
3.5.4.2	Hemmbarkeit der NADPH-Veratmung	57
3.5.5	Mitochondrien mit gehemmter Atmungskette	61
3.5.5.1	Hemmstoff KCN	61
3.5.5.2	Hemmstoffe Amytal, Antimycin A und KCN	61
4.	Diskussion	71
5.	Zusammenfassung	87
6.	Abkürzungen	89
7.	Literaturverzeichnis	90
8.	Lebenslauf	98

1. Einleitung

Seit DAM (14) das antihämorrhagische Vitamin K entdeckte, ist die Diskussion um ein mögliches Eingreifen dieses Vitamins in verschiedene Stoffwechselvorgänge nicht mehr abgerissen. In der folgenden Aufstellung sind die wichtigsten Schritte der seither gemachten Untersuchungen aufgezählt:

- 1954 beschreiben WOSILAIT et al (64) eine Vitamin K_3 -Reduktase in E.coli und tierischen Organen.
- 1957 finden COLPA-BOONSTRA und SLATER (11), daß Keilin-Hartree Herzmuskelpräparationen Menadiol oxidieren können, wobei es sich bei diesem Vorgang nicht nur um Autoxidation des Menadiol handeln kann. Außerdem wird eine Succinat-Vitamin K_3 -Reduktase postuliert.
- 1958 gelingt es ERNSTER (16) ein Flavinenzym im Rattenlebercytosol zu finden, das NADH und NADPH oxidiert. Menadion ist einer der künstlichen Akzeptoren bei diesem Vorgang.
- 1962 isolieren ERNSTER et al (16) dieses Enzym aus dem Zytoplasma der Rattenleberzelle und nennen es DT-Diaphorase.
- 1962 beobachtet SATO (48) eine Vitamin K_3 -abhängige NADPH-Oxidase in den Mikrosomen der Rattenleber.
- 1963 wird die DT-Diaphorase von CONOVER et al (12,13) in den Rattenlebermitochondrien nachgewiesen und daraus isoliert.
- 1965 beweisen MASTERS et al (31), daß die NADPH-cytochrom c Reduktase mit Menadion reagiert. Die von SATO beobachtete Vitamin K_3 -abhängige NADPH-Oxidase scheint damit erklärt zu sein.
- 1969 kann IYANAGI et al (23) auch eine Reaktion der mikrosomalen NADH-cytochrom b_5 Reduktase und der NADPH-cyt.c Reduktase mit p-Benzochinon direkt feststellen. Menadion soll nur über cytochrom b_5 mit der b_5 -Reduktase reagieren.

An der perfundierten Rattenleber fand BRAUSER (unveröffentlicht) bei Zugabe von Menadion zum Perfusat einen erhöhten Sauerstoffverbrauch der Leberzellen.

Im Rahmen dieser Arbeiten hatte ich nun die Frage zu klären, inwieweit sich dieses an der perfundierten Rattenleber beobachtete Phänomen auch an isolierten Mitochondrien, Mikrosomen und isolierten Enzymen nachweisen ließ.

Im einzelnen war also die Frage nach dem Wirkort und Wirkungsmechanismus zu beantworten, d.h. zu klären, an welcher Stelle des Stoffwechsels die in vivo toxische Reaktion tatsächlich abläuft.

Es lag nahe, die schon von den Pionieren der Struktur- aufklärung für die Atmungskette verwendeten Methoden (9,10) in verfeinerter Form anzuwenden. Dabei hat die spektrophotometrische Methode den Vorteil, daß Übergänge zwischen verschiedenen metabolischen Zuständen in Mitochondrien und Mikrosomen reversibel und reproduzierbar beobachtet werden können. Dagegen konnte die polarographische Methode der O_2 -Messung dort gute Dienste leisten, wo die Enzymaktivitäten und Umsatzgrößen interessierten.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Reagenzien, Puffer, Enzyme und Enzym-Test

<u>Substrate:</u> Na-1-glycerophosphat	Serva, Heidelberg
Na-Hydroxybutyrat	"
Albumin aus Rinder- serum, lyophil. rein	"
Crohn Fr. V	"
Pyruvat	Boehringer, Mannheim
Succinat	"
Adenosindiphosphat	"
Nicotinamidadenin- dinucleotid, reduziert	"
Reinheitsgrad II	"
Nicotinamidadenin- dinucleotidphosphat reduziert	"
Reinheitsgrad II	"
Menadion DAB 7, Vitamin K ₃ , öllöslich	Merck, Darmstadt
L(+)-Ascorbinsäure DAB 7	"

<u>Hemmstoffe:</u> Amytal, pharm.	Serva, Heidelberg
Antimycin A, reinst	"
Kaliumzyanid, p.A.	Merck, Darmstadt
Dicumarol	La Roche, Grenzach
Malonsäure, Dinatrium- salz	Schuchardt, München

Lösungs- mittel:

Dimethylsulfoxyd (DMSO, Merck, Darmstadt)
diente als Lösungsmittel für Menadion,
Dicumarol und Antimycin A.

Alle anderen Substanzen wurden in bidest.
Wasser aufgelöst.

Biuret-Reagenz

2,25 g K-Na-Tartrat
0,75 g CuSO₄ · 5 H₂O ad 250 ml 0.2N NaOH
1,25 g KJ

Mitochondrien-Isolationspuffer

0.250 M Sucrose	Südzucker-Raffinade
0.002 M EDTA	Merck, Darmstadt
0.010 M Triäthanolamin-HCL	Boehringer, Mannheim
pH 7.2 mit 8 N NaOH (Merck) eingestellt	

Mitochondrien-Reaktionspuffer ("Mitopuffer")

0.250 M Sucrose	Südzucker-Raffinade
0.001 M KH_2PO_4	Merck, Darmstadt
0.001 M $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$	"
0.001 M $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	"
0.007 M Triäthanolamin-HCL	Boehringer, Mannheim
pH 7.2 mit Triäthanolamin (Merck) eingestellt	

Shrinking-Medium nach SOTTOCASA et al. (50)

1.800 M Sucrose	Südzucker-Raffinade
0.008 M Adenosintriphosphat	Boehringer, Mannheim
0.002 M MgSO_4	Merck, Darmstadt
pH 7.3 mit 1 N KOH (Merck) eingestellt	

Swelling-Medium nach SOTTOCASA et al (50)

0.010 M Triäthanolamin-HCL	Boehringer, Mannheim
0.002 M EDTA	Merck, Darmstadt
pH 7.5 mit 1 N KOH (Merck) eingestellt	

Enzyme

Xanthinoxidase aus Kuhmilch	
Suspension	
EC 1.2.3.2	Boehringer, Mannheim
Glutathionreduktase aus	
Hefe, kristallisiert	
EC 1.6.4.2	"
NADH-Lipoamid-Oxidoreduktase	
(Diaphorase) aus Schweineherz	
Lyophilisat, Reinheitsgrad II	
EC 1.6.4.3	"

Catalase aus Rinderleber
 Kristallsuspension
 EC 1.11.1.6

Boehringer, Mannheim

Säulenmaterial für die Chromatographie

G 75 Sephadex (Molekularsieb)	Pharmacia, Uppsala
DEAE Sephadex (Ionenaustauscher)	"
Tris(hydroxymethyl)aminomethan p.A.	Merck, Darmstadt
Kaliumchlorid p.A.	"
Maleinsäure	"
Ammoniumsulfat, f.biochem.Zwecke	"
Kaliumferricyanid p.A.	"

Enzym-Test

NADH-Ferricyanid-Reduktase-Test

Gemessen wurde die Extinktions-
 abnahme des Kaliumferricyanids
 bei 405 nm im Eppendorf-Photo-
 meter bei 25°C

Testansatz:

0.500 ml 0.1 M Tris-HCl Puffer pH 7.5

0.010 ml 50 mM Kaliumferricyanid

0.010 ml 13 mM NADH

$$\epsilon = 0.9 \text{ cm}^{-1} \text{ mM}^{-1}$$

U = $\mu\text{Mol K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ reduziert
 min

2.1.2 Proteinbestimmung

Protein wurde mit Biuret-Reagenz nach der von BEISENHERZ (3) modifizierten Methode bestimmt. 0,1 ml der zu untersuchenden Probe wurde mit 0,2 ml 5% Trichloressigsäure gemischt, 30 Sekunden gerüttelt und dann scharf abzentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgehoben und Flüssigkeitsreste mit Filterpapier abgesaugt. Dem Pellet wurden dann 0.5 ml Biuret-Reagenz zugesetzt und das Ganze 30 Minuten gerüttelt bis das Pellet gelöst war. Dann wurden 0.5 ml bidest. Wasser zugegeben und die Lösung in einer 1cm-Küvette bei 546 nm im Eppendorf Photometer gemessen. Bei 546 nm und der 1cm-Küvette wurde ein Biuret-Faktor von 37 angenommen.

Der Proteingehalt der Probe errechnete sich aus den Extinktionen vor und nach Zugabe von Kaliumzyanid wie folgt:

$$37 \cdot \left[(E_{\text{probe}} - E_{\text{probe}+\text{KCN}}) - (E_{\text{blind}} - E_{\text{blind}+\text{KCN}}) \right] = \frac{\text{mg Protein}}{\text{ml}}$$

2.1.3 Tiermaterial

Für alle Versuche wurden weibliche Wistar-Ratten, die von der Firma Dr. Thomae G.m.b.H., Biberach, zur Verfügung gestellt wurden, verwendet.

Die Tiere wogen zwischen 150 und 250 Gramm.

Das Lebergewicht schwankte entsprechend zwischen 5 und 15 Gramm.

2.1.4 Isolierung von Rattenlebermitochondrien nach der modifizierten Methode von SCHNEIDER et al (49)

Die Ratte wurde dekapitiert und ausgeblutet, darauf die Leber schnell entnommen und in eiskalten Isolationspuffer gelegt. Nach dreimaligem Waschen in Isolationsmedium wurde die Leber mit einer Schere in etwa linsengroße Stücke zerschnitten und nochmals dreimal in eiskaltem Puffer gespült. Anschließend wurden die gewaschenen Stücke mit 40 ml Medium in ein Potter-Gefäß überführt und bei 300 rpm mit einem Teflon-Stab homogenisiert. Das Homogenat wurde dann auf vier Zentrifugenbecher mit je 45 ml Fassungsvermögen verteilt und die Becher jeweils auf 45 ml mit Isolationsmedium aufgefüllt. Darauf folgten drei Zentrifugenschritte mit der SORVALL Zentrifuge Typ RC2-B (Rotor r= 4.25 inch). Der erste Durchgang bei 750xg dauerte 10 Minuten. Das Pellet wurde verworfen, der Überstand in vier neue Zentrifugenbecher abgegossen und 10 Minuten bei 4000xg zentrifugiert. Der nun gewonnene Überstand wurde anschließend für die Mikrosomenpräparation (s.2.1.6) weiterverwendet. Das Pellet dieses zweiten Schrittes wurde in Isolationsmedium resuspendiert, das Homogenat auf zwei neue Becher verteilt und mit Puffer auf insgesamt 90 ml aufgefüllt. Der dritte Zentrifugenschritt bei 7000xg sedimentierte gereinigte Mitochondrien. Nach Dekantieren des Überstandes wurde das Pellet in 1ml Isolationsmedium aufgenommen und stellte die Mitochondrien dar. Alle Arbeiten wurden bei 0-4°C ausgeführt. Die Mitochondriensuspension (durchschnittlich 5mg Protein pro Gramm Leber) zeigte gekoppelte Atmung für ca. 4 Stunden.

2.1.5 Präparation von angereicherter Mitochondrien-Außenmembran

Die Präparation erfolgte in Anlehnung an die von SOTTOCASA et al (50) beschriebene Methode.

Das wie in 2.1.4 gewonnene Mitochondrienpellet nach dem dritten Zentrifugenschritt, wurde bei 0°C in 120 ml Swelling-Medium suspendiert und 10 Minuten langsam von Hand in einem Pottergefäß mit dem Teflon-Stab homogenisiert. Dann wurden 40 ml Shrinking-Medium zugesetzt und weitere 10 Minuten homogenisiert. Anschließend wurde das Homogenat in 20 ml aliquots 2 mal 5 Sekunden beschallt (Branson Sonifier Model S 75 Mikro Tip, 3.5 A output). Danach wurde das beschallte Homogenat 15 Minuten bei 25000xg in der SORVALL Zentrifuge zentrifugiert. Das Pellet (Mitochondrien ohne Außenmembran und Teile der Außenmembran) wurde verworfen, der Überstand in neue Becher überführt und 60 Minuten bei 105000xg auf der SPINCO Ultrazentrifuge zentrifugiert. Das erhaltene Pellet wurde in 1ml Mitochondrien-Isolationsmedium aufgenommen und enthielt weitgehend nur Außenmembran, wie elektronenoptische Bilder zeigten. (Abb. 1)

2.1.6 Präparation von Rattenlebermikrosomen

Auch diese Präparation erfolgte in Anlehnung an die von SOTTOCASA beschriebene Methode (50). Der Überstand nach der zweiten Zentrifugation bei der Isolierung von Mitochondrien (2.1.4) wurde 15 Minuten bei 20000xg auf der SORVALL Zentrifuge zentrifugiert und das Pellet verworfen. Der neue Überstand wurde dann bei 105000xg 60 Minuten auf der SPINCO Ultrazentrifuge abzentrifugiert. Das so entstandene Pellet wurde in 2ml Mitochondrien-Isolationsmedium aufgenommen und stellte die Mikrosomen dar.

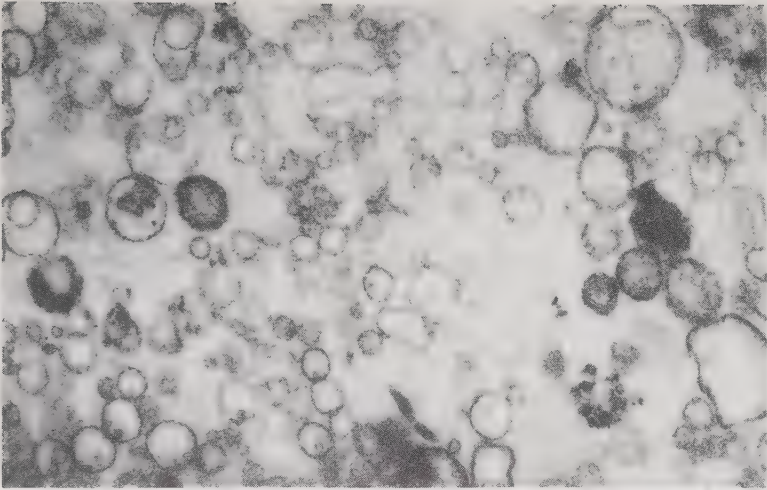


Abb. 1 Elektronenmikroskopische Aufnahme
von angereicherter Mitochondrien-
Außenmembran Vergr. 21000fach
Aufnahme Dr. Sauer

2.1.7 Präparation von mikrosomaler NADH-cytochrom b_5 Reduktase (EC 1.6.2.2) und mikrosomalem cytochrom b_5

Die Präparation der Reduktase wurde weitgehend nach der von TAKESUE und OMURA (56,57) beschriebenen Methode ausgeführt. 550 Gramm Rattenlebern wurden in eiskaltem Isolationsmedium gewaschen und dann unter Zusatz des doppelten Volumens an Puffer im Multimix Stufe 1 60 Sekunden homogenisiert. Das Homogenat wurde anschließend 15 Minuten bei 7000xg auf der SORVALL RC2-B zentrifugiert, um die Mitochondrien zu sedimentieren. Die Lysosomen verblieben dabei im Überstand, der weiterverwendet wurde. Nach 60 Minuten bei 105000xg auf der SPINCO Ultrazentrifuge waren die Mikrosomen zusammen mit den Lysosomen sedimentiert. Das Pellet wurde in 400 ml 0.15 M KCL-Lösung

(pH 7.5 mit Zusatz von 1mM EDTA) gepottert und nochmals bei 105000xg 60 Minuten gewaschen. Das so von Hämoglobin weitgehend gereinigte Pellet wurde anschließend in 400 ml 0.1 M Tris-Maleat Puffer, pH 5,5, aufgenommen und gepottert. Danach wurde die Suspension bei 37°C im Wasserbad unter Zusatz von 100 U/ml Penicillin 5 Stunden inkubiert und langsam gerührt. Nach Inkubation wurde bei 45000xg auf der SORVALL zentrifugiert, das Pellet verworfen, und der Überstand auf pH 7 zurückgestellt mit 1 N NaOH. Unter Zusatz von Ammoniumsulfat (45% Sättigung) wurde die Lösung bei 0°C zwei Stunden gerührt. Nach erneuter Zentrifugation von 15 Minuten bei 45000xg wurde der dekantierte Überstand auf 80% Sättigung mit Ammoniumsulfat gebracht und weitere zwei Stunden bei 0-4°C gerührt. Nach Zentrifugation (15 Minuten bei 45000xg) wurde das Pellet in 20 mM Tris-HCl Puffer (pH 8) aufgenommen und anschließend auf einer G 75 Sephadex Säule (4x100 cm) chromatographiert. Die Fraktionen mit hohem Ferricyanid-Reduktase Gehalt wurden gesammelt, gepoolt und über Nacht gegen 20mM Tris-HCl Puffer (pH 8) dialysiert. Das Dialysat wurde dann auf eine DEAE Sephadex Säule (2x40 cm) aufgetragen und mit einem Konzentrationsgradienten von 40 mM Tris-HCl Puffer (pH 8) auf 40 mM Tris-HCl Puffer/0.15 M KCl-Puffer eluiert. Die aktivsten Fraktionen wurden wieder gepoolt und zur Verminderung des Volumens ein zweites Mal über die DEAE Sephadex Säule (2x20 cm) geschickt. Das so gewonnene Enzym hatte eine Ferricyanid Reduktase Aktivität von 400 U/ml (spezifische Ferricyanid Reduktase Aktivität 500 U/mg Protein). Der Flavingehalt der Reduktase war 12 nMol FAD/mg Protein.

Die Reduktase wurde bis zum jeweiligen Verbrauch bei -23°C eingefroren. Innerhalb von 4 Monaten war bei dieser Temperatur kein nennenswerter Aktivitätsverlust zu beobachten.

Die Tabelle 1 gibt nochmals einen Überblick von der Anreicherung der b₅-Reduktase.

Cytochrom b_5 wurde nach der Methode von OMURA und TAKESUE (40) präpariert. Dieses Cytochrom b_5 wurde t- b_5 genannt, also trypsin-isoliertes b_5 im Gegensatz zum d- b_5 , das mit Detergentien nach der Methode von MIHARA (65) präpariert wurde.

Tabelle 1

Reinigungsschritte bei der Präparation
der NADH-cytochrom b_5 Reduktase
(NADH-Ferricyanid Reduktase Aktivität)

Reinigungsschritt	Gesamt- Protein mg	Gesamt- Volumen ml	NADH-FeCy- Aktivität U/ml	Gesamt- Aktivität U	spez. Akti- vität U/mg	Ausbeute %
Mikrosomen in Tris-Maleat	5180	400	55	22000	4.2	100
Überstand nach Inkubation	810	350	60	21000	25.9	95.4
Pellet nach 80% Ammoniumsulfat- Fällung in Tris	275	12	1078	12936	47.0	58.8 ^e
Fraktion 20-26 gepoolt nach G 75 Sephadex	100	84	140	11760	117.6	53.4
nach 1. DEAE- Säule (gepoolt)	11.5	78	104	8112	705.4	36.8
nach 2. DEAE- Säule	4.8	6	400	2400	500	10.9

2.2 Spektralphotometrische Versuchs- und Meßanordnung

2.2.1 Durchlichtspektrophotometrie

Die mitochondrialen und mikrosomalen Cytochrome sowie die anderen Redoxsysteme (Nicotinamid-Dinucleotide, Flavine und Nicht-Häm-Eisen Systeme) zeigen bei Elektronenübergängen hinsichtlich der Absorption, Fluoreszenz oder Elektronen-Spin-Resonanz markante Änderungen in ihrem spektralen Verhalten. Diesen Umstand macht man sich zunutze, um an hochintegrierten Systemen (Mitochondrien, Mikrosomen und perfundierten Organen) Informationen über die Regulation von Stoffwechselwegen zu gewinnen, ohne das zu untersuchende System selbst zu zerstören. Die ersten Versuche in dieser Richtung wurden von CHANCE (7) unternommen, wobei er sich eines "Double-Beam"-Photometers bediente.

Das hier verwendete Rapiidspektroskop "München" T 13/21 der Deutschen Howaldtswerke AG, Kiel erlaubt

- a) die Registrierung von 40 Spektren/sec.
- b) mit dem Zusatz von Brauser (4) die kontinuierliche Zweiwellenlängenmessung
- c) die Registrierung von Differenzspektren aus nacheinander aufgenommenen Summenspektren mittels Rechneranschluß (Abb.2)

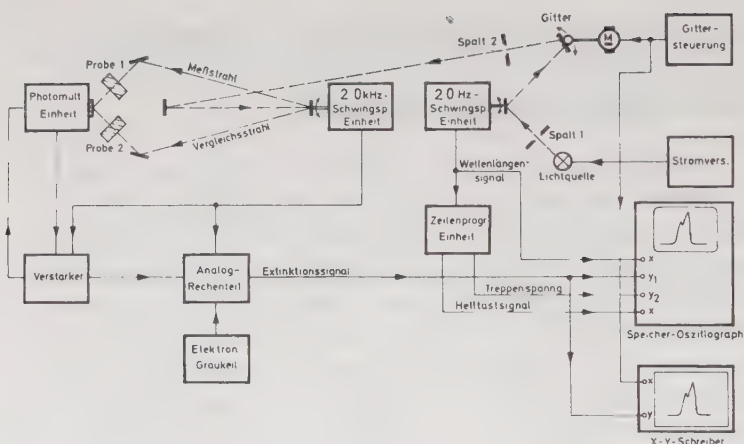


Abb. 2 Blockschaltbild des Rapiidspektroskops
"München" T 13/21 der Deutschen
Howaldtswerke AG, Kiel

2.2.1.1 Photometrische Meßanordnung

Der von einer Xenon-Hochdrucklampe erzeugte Lichtstrahl wird über einen Schwingungsspiegel mit einer Frequenz von 25 Hz und einstellbarer Amplitude auf ein Beugungsgitter (Monochromator) geworfen und durch einen Spalt auf einen Hochfrequenz-Schwingungsspiegel (Torsionsdraht mit angeregter Eigenschwingung von 20 kHz) abgebildet.

Die Schwingung des ersten Spiegels bewirkt, daß zeitabhängig ein Frequenzband entsteht, dessen Breite von der Schwingungsamplitude abhängt. Die Bandmitte kann durch Verdrehen des Gitters vorgewählt werden. Der Hochfrequenzspiegel dagegen verteilt das Licht auf Vergleichs- und Meßstrahl. Nach dem Durchtritt des Meßstrahls durch die Probe fällt das Licht über eine Ulbricht-Kugel in den Photo-

multiplier (9958 QB), wo es in ein elektrisches Signal umgewandelt wird. Das Signal wird verstärkt und auf einem Oszillographen dargestellt, der über das 20 kHz Signal gesteuert wird. An den Verstärker schließt sich ein Analogrechner an, der aus dem Vergleich von Meß- und Referenzstrahl die Extinktion in Abhängigkeit von der Wellenlänge ermittelt.

Das Gerät hat ein Rauschen von 10^{-2} E.

2.2.2 Differenzspektren

Messungen von Absorptionsbanden im Bereich der Milli-Extinktionseinheiten erfordern eine sehr große Empfindlichkeit. Da bei den üblichen Spektralphotometern, die mit Meß- und Vergleichsküvette arbeiten, die optische Dichte der Probe im Vergleichsstrahl in der Größenordnung von 10^{-3} schwankt, kann durch Speicherung und Aufsummieren einer Anzahl (n) von Spektren eines frequenzmodulierten Photometers (z.B. beim Rapiidspektroskop) in einem Mittelwertrechner das Signal/Rausch-Verhältnis um den Faktor $\sqrt{n}$ erhöht werden.

Bei diesem von BRAUSER (5) eingeschlagenen Weg betrifft die Drift infolge der kurzen Registrierzeit (40 Spektren/Sekunde) eines Einzelspektrums alle Wellenlängen in gleichem Umfang, d.h. die Basislinie des Spektrums wird nur parallel zur Null-Linie verschoben.

In der hier gewählten Meßanordnung gelangt das mit dem Rapiidspektroskop gewonnene Spektrum (vorgewählte Mittelwellenlänge und Bandbreite) über den angeschlossenen Analog-Digitalumsetzer in einen FABRI-TEK Kleincomputer Model 1072, der als Mittelwertrechner fungiert. Dieses Gerät hat vier Speicherplätze. Im ersten Speicher wurde ein Absolutspektrum

des zu untersuchenden Küvetteninhalts vor Substratzugabe (= Vergleichsspektrum) aufgezeichnet. Nach Substratzugabe wurde dann das neue Absolutspektrum (= Meßspektrum) im zweiten Speicherplatz aufgenommen und das Vergleichsspektrum des ersten Speichers digital abgezogen. Das so erhaltene Differenzspektrum im zweiten Speicherwerk konnte entweder über den Oszillographen des FABRI-TEK digital oder analog in beliebigem Maßstab abgelesen oder über einen x/y-Schreiber (PHILIPS) auf Millimeterpapier ausgeschrieben werden. Auf dem Oszillographen konnte dabei jeder einzelne Punkt des Spektrums angesteuert werden und die Extinktionsdifferenz in Digits sowie die Nummer des Spektren-Speicherkanals (= Wellenlänge) ausgedruckt werden. Dadurch wurde die quantitative Auswertung erleichtert.

2.2.3 Wellenlängeneinstellung am Rapidspektroskop

Das Spektrum eines NEODYM-Filters wurde auf dem CARY 118 C Photometer abgetastet. Dabei ergaben sich folgende charakteristische Absorptionsbanden im Neodym-Spektrum:

Maximum	403.5	nm
Maximum	528.85	nm
Minimum	558	nm
Maximum	573.3	nm
Minimum	581.4	nm
Maximum	586.3	nm

Der Abstand zwischen dem Maximum 528.85 nm und dem Minimum 558 nm entsprach 188 Milliextinktionseinheiten. Zur Eichung der Wellenlängen am Rapidspektroskop wurde das Maximum 528.85 nm des Neodym-Filters herangezogen. Diese

Wellenlänge im Eichspektrum war mit dem Kanal 119 (= 528.8 nm) des Rapiidspektroskops identisch, wenn die Spektrenmitte 530 nm und die Bandbreite 100 nm gewählt wurden.

Mit dem Neodym-Filter bekannten Absorptionsmaximums (528.85 nm) wurde auch die Einstellung der Bandbreite vorgenommen. In den Meßkanal wurde das Filter eingeschoben und die gewünschte Bandbreite zur Spektrenmitte (530 nm) am Wellenlängenrad addiert. Die Amplitude des 20 Hz-Spiegels wurde dabei so gewählt, daß auf dem Oszillographen (Ordinate: E; Abszisse: nm) gerade die Hälfte der Neodym-Spektrenmitte sichtbar wurde.

2.2.4 Absorptionsmaxima der mitochondrialen und mikrosomalen Pigmente

Nach CHANCE und HESS (10) sind den Pigmenten der Atmungskette bestimmte Absorptionsmaxima zuzuordnen. Für die in dieser Arbeit beschriebenen Spektren wurden folgende Wellenlängen zur Auswertung herangezogen:

<u>Cytochrom</u>	<u>Wellenlänge</u>	<u>Kanal-Nr.</u>
	nm	am Rapiidspektroskop Spektrenmitte 570 nm Bandbreite 100 nm
aa ₃	605	176-181
b	564	102-107
b ₅	556	95
cc ₁	550	86

2.3 Kombination von spektrophotometrischer und polarographischer Methode

Um gleichzeitig O_2 -Verbrauch und Spektren bei derselben Probe aufzeichnen zu können, wurde eine 1-ml-Küvette mit $d=1\text{cm}$ verwendet, die auf einen Aluminiumträger aufgeschraubt wurde und mit einem Spezialkopf aus Plexiglas versehen war. (Abb. 3,4)

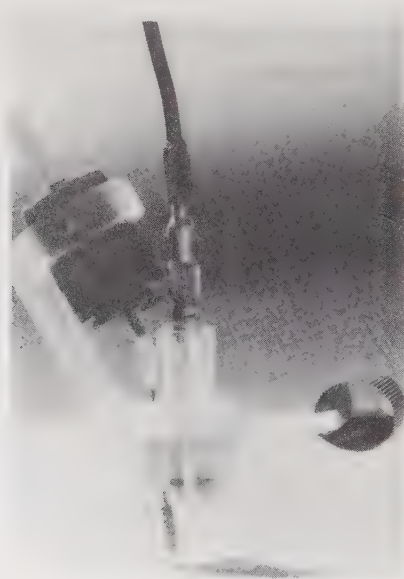


Abb. 3 Küvette mit O_2 -Pt-Mikroelektrode und O_2 -Rührer zur gleichzeitigen Photometrie und Polarographie

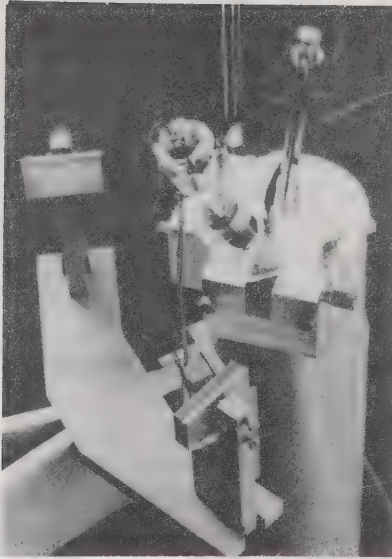


Abb. 4 Küvette mit O_2 -Pt-Mikroelektrode
im Strahlengang des Rapidspektroskops

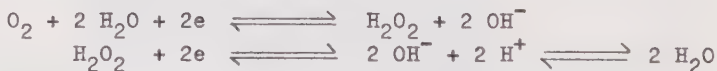
2.3.1 Küvettenanordnung zur gleichzeitigen Photometrie und Polarographie

Der Spezialkopf wird mit einer Gummidichtung luftdicht auf die Küvette gepreßt und mit der Küvettenhalterung am Aluminiumträger befestigt. Dieser Kopf enthält drei Bohrungen. In die größte wurde eine O_2 -Pt-Mikroelektrode eingeschraubt, durch die zweite ein feiner Drahtführer geführt, den ein Elektromotor treibt. Der Rührer verhindert ein Absetzen der Probensuspension, sorgt für eine rasche Durchmischung der zugegebenen Lösungen und dient außerdem dazu, daß die Diffusionsschicht an der Elektrodenmembran konstant gehalten wird. Denn, um einen konstanten Polarisationsgrenzstrom an

der Elektrode zu erhalten, muß für eine gleichbleibende Diffusionskonstante gesorgt werden (28). Auf die dritte Bohrung kann eine Eppendorf-Pipettenspitze aufgesetzt werden, durch die mit einer Mikroliter-Spritze (Hamilton, USA) Lösungen in Mengen zwischen 0.0005 ml und 0.1 ml zugegeben werden konnten. Die Dichtung der Küvette reichte aus, um gute Anoxien erreichen zu können. Aufgrund der Bohrungen sind jedoch keine absolut O₂-freien Bedingungen erreichbar gewesen. Beim Zusammensetzen der puffergefüllten Küvette mit dem Spezialkopf wurde auf Luftblasenfreiheit geachtet.

2.3.2 O₂-Pt-Mikroelektrode

Das Meßprinzip ist das heute allgemein benutzte Verfahren, den bei der kathodischen Reduktion des Sauerstoffs fließenden Strom zu messen. Der strombegrenzende Faktor in der Meßkette ist die O₂-Reduktion nach folgender Gleichung (20):



Die Methode ist nur gültig, wenn folgende Kriterien erfüllt sind:

- (1) an der Elektrodenreaktion der Meßelektrode ist nur Sauerstoff beteiligt,
- (2) bei der Messung besteht nur geringer Sauerstoffverbrauch,
- (3) die Bezugsselektrode ist nicht polarisierbar, d.h. sie muß eine lineare Strom-Spannungs-Charakteristik haben,
- (4) die Diffusionsschicht ist konstant.

Die in diesem Hause konstruierte O_2 -Pt-Mikroelektrode trägt diesen Bedingungen Rechnung. Denn

- (1) die Teflonmembran erlaubt nur ungeladenen Molekülen, d.h. hier also O_2 , den Durchtritt
- (2) bei einem pO_2 von 1000 mb (=750 Torr) ist der Strom nur 10 nA. Das bedeutet, daß das Meßsystem selbst nur 1 pMol O_2 /min verbraucht. Dies ist für unverfälschte Messungen niedriger pO_2 (nMol-Bereich) in kleinen Volumina wichtig
- (3) die Platinkathode hat einen Durchmesser von 20 μ m. Ihr Glasmantel ist von einem Silberrohr (Anode) umgeben, das als Bezugselektrode dient. Silber und die übrige Abschirmung haben Massepotential, wodurch elektrische Störungen von Seiten des zu messenden Mediums weitgehend ausgeschlossen sind. Platin und Silber sind durch einen KCl-Elektrolyten (0.1N KCl) verbunden und durch eine 12 μ m dicke Teflonmembran vom Meßmedium getrennt. Ag/AgCl hat als Elektrode zweiter Art ein konstantes Potential.
- (4) Der Rührer sorgt für eine konstante Diffusionskonstante an der Membran, weil die Diffusionsschicht konstant gehalten wird.

Die elektrische Verbindung zwischen Elektrode und dem pO_2 -Meter (6) erfolgt über ein dünnes Teflonkabel mit Subminax/BNC-Steckern.

Das pO_2 -Meter hat ein Rauschen von 10^{-13} A.

Beziehen der Elektrode:

Eine gelochte Gummiplatte wird auf einen Plexiglasring gelegt. Auf das Loch der Platte kommen nun nacheinander ein 2x2 cm großes Stück Teflonfolie, ein Tropfen 0.1 N KCl-

Lösung, ein 2x2 cm großes Stück Cellophan-Folie, ein Tropfen 0:1 M KCl-Lösung. Die Elektrode wird in diesen letzten Tropfen blasenfrei eingetaucht und mit beiden Folien zusammen durch das Loch der Gummiplatte einen Zentimeter tief eingedrückt. Die Membranen auf der Oberfläche der Elektrode sollten falten- und luftblasenfrei sein. Nun werden die Membranen mit einem Gummischnurring an der Elektrode befestigt. Dazu wird der Gummischnurring auf das äußerste Ende eines Metallapplikators geschoben, der Applikator auf die Elektrode aufgesetzt und der Ring in die hierfür vorgesehene Rille der Elektrode geschoben. Nachdem die Membranteile oberhalb der Gummiplatte abgetupft worden sind, wird die Elektrode vollends durch die Platte geschoben, und die überstehenden Enden der Membranen abgeschnitten. Jetzt kann die Elektrode in den Spezialkopf der Küvette eingeschraubt werden. Der Gummischnurring wirkt dabei gleichzeitig als Dichtung.

2.3.3 Eichung der Elektrode

Die O_2 -Pt-Mikroelektrode wurde an das pO_2 -Meter angeschlossen und von dort (Ausgang 0-10 V) eine Verbindung zum Schreiber (SERVOGOR S RE 511) hergestellt. Der Schreiber wurde auf 1 V calibriert eingestellt, wenn das Medium in der Küvette luftgesättigt war. Aufgezeichnet wurde mit dem Schreiber die Spannung/Zeit der Elektrode. Nach Verlauf von 20 Minuten wurden 0.010 ml Dithionit-Lösung in die Küvette einpipettiert. Der sich jetzt einstellende Wert auf der Schreiberskala wurde als Nullpunkt angesehen (vollständige Anoxie). Danach wurde von calibriert auf variabel umgeschaltet und die Skala von 0 bis 92 Skalen-

teile gespreizt. Dabei entsprachen 92 Skalenteile 230 nMol O_2 in der 1 ml-Küvette, bei 25°C.

2.3.4 Berechnung des O_2 -Gehaltes in der Küvette

Zur exakten Messung hätte der jeweilige Luftdruck in München und die daraus resultierende veränderte Löslichkeit des O_2 berechnet werden müssen. Der so entstandene Fehler war jedoch gering gegen den Verdünnungseffekt bei der Zugabe von Substraten und wurde daher vernachlässigt. Als Grundlage für die O_2 -Berechnung wurde ein Luftdruck für München (514 ü.N.N.) von 960 mb und eine Temperatur von 25°C angenommen. Daraus ergab sich der O_2 -Gehalt des Mitoreaktionspuffers mit 0,23 mM. Diese Konzentration errechnete sich wie folgt: Wasserdampfdruck 32 mb, Luftdruck 960 mb, Bunsen-scher Löslichkeitskoeffizient für O_2 bei 25°C 0,02831 (15) Molvolumen O_2 22,39 :

$$\frac{0,02831 \cdot 928}{1013 \cdot 22,39} = 1,1583 \text{ mM}$$

Korrekturfaktor für 0.25 M Sucrose $\frac{0,0579 \text{ mM}}{1,1004 \text{ mM bei } 100\% O_2}$

Bei einem O_2 -Anteil der Luft von 20,9 % entspricht das 230 nMol O_2 /ml Lösung oder 0.23 mM.

3. Ergebnisse

3.1 Nicht-Enzymatische Reaktion von Menadion mit Elektronendonatoren

3.1.1 Na-Ascorbat

Es existieren Stoffe, die Menadion direkt reduzieren können, wie FIESER (17) feststellte. Näher untersucht wurde hier die

Wirkung von Ascorbat (pH 7) auf Menadion, da bei diesem Redoxvorgang eine nicht-enzymatische Reaktion stattfindet (55). Mit der O_2 -Pt-Elektrode konnte bei diesem Experiment Sauerstoffverbrauch registriert werden. Offenbar entsteht Menadiol, das autooxidiert. Die Reaktion wurde in Mitopuffer pH 7.2 verfolgt (Abb. 5)

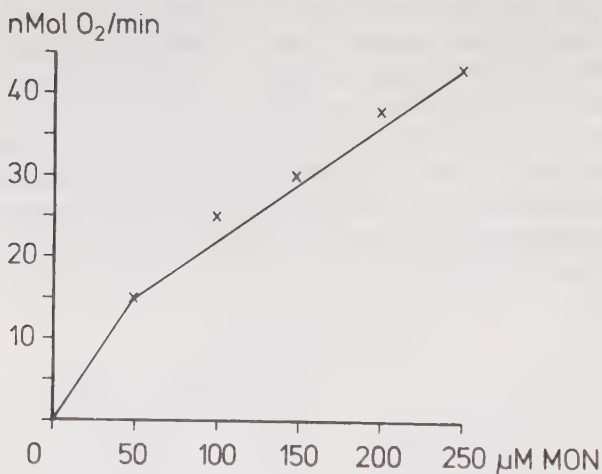


Abb. 5 Graphische Darstellung des Sauerstoffverbrauchs pro Minute in Abhängigkeit von der Menadion Konzentration
Die Küvette enthielt 1ml Mitopuffer
5 mM Ascorbat und Menadion.

Umgekehrt war auch bei konstanter Menadionmenge in der Küvette die Ascorbat-Konzentration titrierbar und führte zu gesteigertem O_2 -Verbrauch. (Abb. 6).

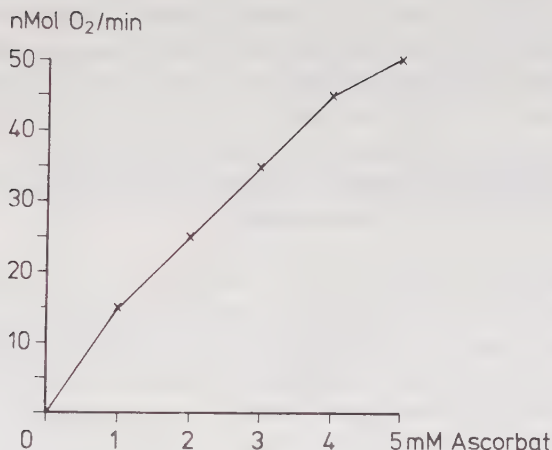


Abb. 6 Graphische Darstellung des O_2 -verbrauchs pro Minute in Abhängigkeit von der Ascorbat-Konz. Die Küvette enthielt in 1ml Mitopuffer 250 μ M Menadiol und Ascorbat

Katalase (10 μ g/ml) konnte nur 10 % des verbrauchten Sauerstoffs aus H_2O_2 freimachen. Die ablaufende Autoxidation von Menadiol muß also weitgehend Wasser als Reaktionsprodukt entstehen lassen.

Eine Autoxidation von Ascorbat wurde erst in Konzentration von mehr als 20 mM beobachtet. Der experimentell bestimmte Wert der Ascorbat-Autoxidation lag bei 0,33 nMol O_2 /min/ μ Mol Ascorbat.

3.1.2 NAD(P)H

Die beiden reduzierten Nicotinamid-Dinucleotide zeigten bei einer Konzentration von 1mM keine direkte reduzierende Wirkung auf Menadion (0.5 mM). Nach Inkubation der beiden Substanzen in der Küvette von 15 Minuten war kein O_2 -Verbrauch zu registrieren.

3.2 Menadionwirkung auf die isolierte NADH-cytochrom b_5 Reduktase aus Mikrosomen

Anhand dieses Enzyms war es möglich, die an Mikrosomen, Mitochondrien und angereicherter Mitochondrien-Außenmembran gemachten Befunde genauer zu studieren. Jetzt konnte im Enzym-Modell-System jeweils cytochrom b_5 weggelassen oder zugegeben werden, was einen großen Vorteil gegenüber intakten Zellorganellen bedeutete, wo die cytochrom- b_5 bedingten Begleitreaktionen nicht kontrollierbar waren.

3.2.1 Charakterisierung der Reduktase

Die Reduktase hatte keine meßbare NADPH-cyt.c-Reduktase Aktivität und war frei von cytochrom b_5 . (<20 pMol cyt b_5 /mg Reduktase (spektrophotometrisch). Obwohl dieses Enzym nur für NADH spezifisch sein soll, konnte eine Reduktion von cytochrom b_5 durch NADPH beobachtet werden, was in Übereinstimmung mit TAKESUE (57) war.

Während die b_5 -Reduktase eine starke NADH-Ferricyanid-Reduktase Aktivität zeigte (500 U/mg), fehlte ihr jegliche NADPH-Ferricyanid Aktivität.

3.2.2 Atmung der b_5 -Reduktase mit den Elektronendonatoren NAD(P)H ohne cytochrom b_5 im System

Das System Reduktase/NAD(P)H/Menadion verbrauchte Sauerstoff, d.h. die b_5 -Reduktase katalysierte direkt den Elektronenübergang von NADH und NADPH auf Menadion. Dabei war vorher ausgeschlossen worden, daß Menadion eventuell direkt mit den Nicotinamid-Dinucleotiden reagiert (3.1.2). Bisher war bekannt, daß die Reduktase NADH mit Menadion als Akzeptor nur oxidiert, wenn cytochrom b_5 vorhanden ist (23).

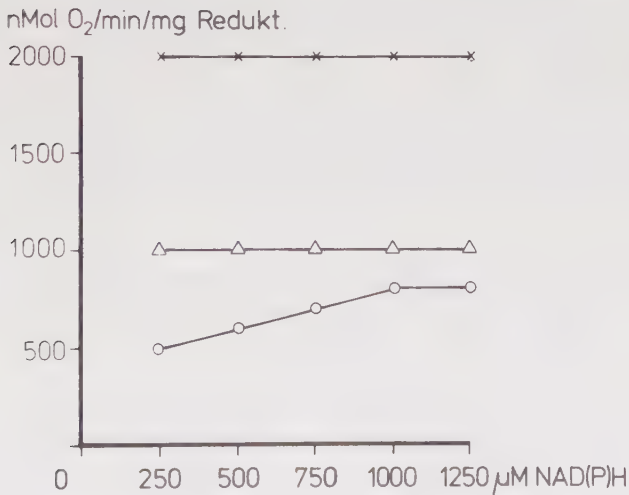


Abb. 7 Graphische Darstellung des O₂-Verbrauchs pro Minute und mg Reduktase in Abhängigkeit von der NAD(P)H Konzentration. Die Küvette enthielt in 1ml Mitopuffer 250 µM Menadion, 10 µg Reduktase und

x x x NADH + 0.25 nMol cyt.b₅

Δ Δ Δ NADH

o o o NADPH (mit 0.25 nMol cyt.b₅:
gleiche Kurve)

Im Gegensatz dazu ergaben meine Messungen beträchtliche Atmungsgrößen auch in Abwesenheit von cytochrom b_5 , wie es der Vergleich in Abb. 7 zeigt.

3.2.2.1 Hemmbarkeit der NAD(P)H-Veratmung ohne cytochrom b_5 im System

Amytal (2mM) und KCN (1mM) zeigten keinerlei Einfluß auf die katalysierte NAD(P)H-Atmung mit Menadion als Akzeptor.

Überraschend war die Hemmung durch Antimycin A.

Dabei hemmten 90 μM die NADPH-Atmung und 110 μM die NADH-Veratmung jeweils zu 50%. Mit 300 μM Antimycin A konnte die Atmung im Enzymsystem ganz gestoppt werden. Eine Hemmung in stöchiometrischem Verhältnis zu Menadion war nicht zu beobachten.

Dicumarol konnte nur die NADPH-Oxidation hemmen. Halbmaximale Hemmung der Atmung wurde durch $4 \cdot 10^{-5}\text{M}$ erreicht. Die Hemmung war durch 0.8 mg/ml Rinderalbumin wieder aufhebbar.

ADP hemmte ebenfalls nur die NADPH-Atmung. 300 nMol/ml reichten aus um halbmaximale Atmungshemmung zu bewirken.

3.2.3 Auswertung von Spektren

Am Beispiel des Ergebnisses aus Tab. 2 Nr. 1 soll die Auswertung eines Differenzspektrums (Abb. 8) demonstriert werden. Bei diesem Spektrum, das im Wellenlängenbereich 520-620 nm mit FABRI-TEK aufgenommen wurde, entspricht 1 mm (des Originalspektrums) 0.0678 mE. Der durch 1 mM NADH erzeugte Peak (556 nm) des reduzierten cytochrom b_5 (Abb. 8 Kurve 2) hat ein $\Delta E = 5.01$ mE bezogen auf den isosbestischen Punkt. Da aus dem Extinktionskoeffizienten $\varepsilon(\text{red-ox})_{556-570} = 20 \text{ cm}^{-1} \text{ mM}^{-1}$ (27) folgt, daß 20 mE einer Konzentration von 1 nMol cytochrom b_5 /ml entsprechen, errechnet sich für 5.01 mE nach dem Lambert-Beerschen Gesetz unter Berücksichtigung

der Verdünnung in der Küvette eine Konzentration von $0.25 \text{ nMol cyt. } b_5/\text{ml}$.

Bei Zugabe von $50 \text{ } \mu\text{M}$ Menadion (Abb. 8 Kurve 3) wurden 21.6% des reduzierten $\text{cyt. } b_5$ oxidiert, weitere $200 \text{ } \mu\text{M}$ Menadion (Abb. 8 Kurve 4) zeigten 51.3% oxidiertes cytochrom b_5 .

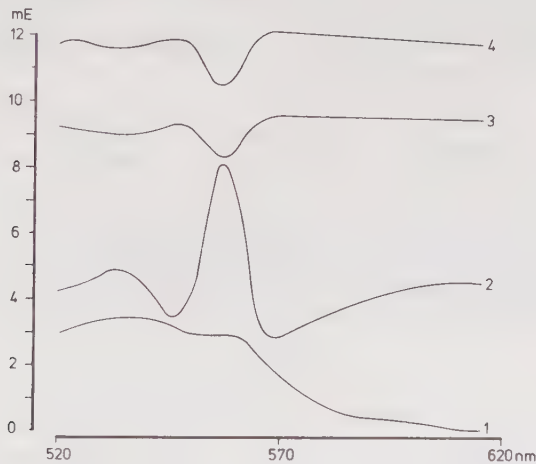


Abb. 8 Differenzspektren des cytochrom b_5 aufgenommen im Wellenlängenbereich 520-620 nm mit FABRI-TEK und auf Philips x/y-Schreiber ausgeschrieben. Die Küvette enthielt in 1ml Mitopuffer $10 \text{ } \mu\text{g}$ Reduktase und $0.25 \text{ nMol cytochrom } b_5 \text{ oxid.}$ = Kurve 1
 + 1 mM NADH = Kurve 2
 + $50 \text{ } \mu\text{M Menadion}$ = Kurve 3
 + $200 \text{ } \mu\text{M Menadion}$ = Kurve 4

3.2.4 Atmung der b_5 -Reduktase mit den Elektronen- donatoren NAD(P)H und cytochrom b_5 im System

Wie aus der Abb. 7 zu ersehen ist, beschleunigte die Anwesenheit von 0.25 nMol cytochrom b_5 (t - b_5) den O_2 -Verbrauch auf das Doppelte. Grundsätzlich ließen sich gleiche Ergebnisse auch mit d - b_5 erzielen. Die NADPH-Oxidation blieb von cytochrom b_5 unbeeinflusst.

Bei der Verwendung von cytochrom b_5 im Enzym-System



wurde das cytochrom bei der Oxidation von NADH durch 250 μ M Menadion zu 51.3 % oxidiert, wohingegen bei der Oxidation von NADPH durch 250 μ M Menadion eine b_5 -Oxidation von 100 % gefunden wurde (Tab. 2 Nr. 1,2).

Bei der Titration von NADPH blieb cytochrom b_5 stets oxidiert, wenn Menadion (250 μ M) vorgegeben worden war. (Tab. 2 Nr. 4). NADH dagegen führte schon in geringsten Konzentrationen ($5 \cdot 10^{-5}$ M) zu voller Reduktion, auch wenn Menadion derselben Konzentration schon vorhanden war.

Abb. 9 zeigt den Verlauf eines typischen Einzelversuches, bei dem die NADH-Oxidation polarographisch und spektrophotometrisch die Zustandsänderung des cytochroms b_5 verfolgt wurde.

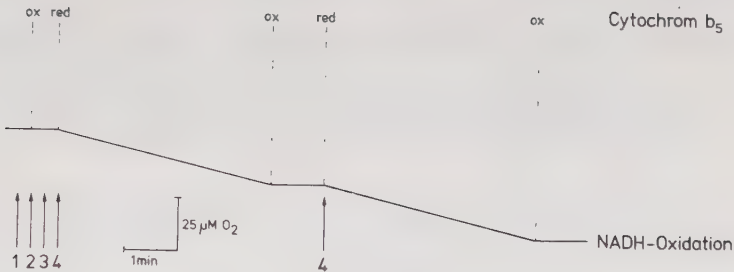


Abb. 9 Atmungsverlauf bei der NADH-Oxidation gemessen mit der O_2 -Pt-Mikroelektrode unter gleichzeitiger Aufnahme von Differenzspektren im Bereich 520-620 nm. Die Küvette enthielt in 1ml Mitopuffer

- 1=+10 μ g Reduktase
- 2=+0.2 nMol cytochrom b_5
- 3=+50 μ M Menadion
- 4=+50 μ M NADH

Ohne cytochrom b_5 konnte eine solche genaue Abhängigkeit von O_2 -Verbrauch und NADH-Oxidation mit Menadion als Akzeptor nicht beobachtet werden.

NADPH wurde weder mit noch ohne cytochrom b_5 in so starkem Maße oxidiert.

3.2.4.1 Hemmbarkeit der NADPH-Atmung mit cytochrom b_5 im System

Amytal (2mM), Antimycin A (0.1 mM) und KCN (1mM) hatten keinen Einfluß auf den gemessenen O_2 -Verbrauch mit NADPH und Menadion als Akzeptor. Keiner dieser Stoffe konnte die NADH-Atmung hemmen.

Dicumarol und ADP hemmten nur die NADPH-Atmung in denselben Konzentrationen, wie sie bei der Reaktion der Reduktase ohne cytochrom b_5 im System beschrieben wurden (3.2.2.1)

3.2.5 Unterschiedliches Verhalten der b_5 -Reduktase mit den Elektronendonatoren NADH und NADPH

Bei gleicher Konzentration der Nicotinamid-Dinucleotide war der O_2 -Verbrauch bei der Veratmung von NADPH im Vergleich zu NADH stets geringer, wenn Menadion als Elektronenakzeptor verwendet wurde. (Abb. 10).

Einen Überblick von diesem unterschiedlichen Verhalten geben auch die Tabellen 2 und 3.

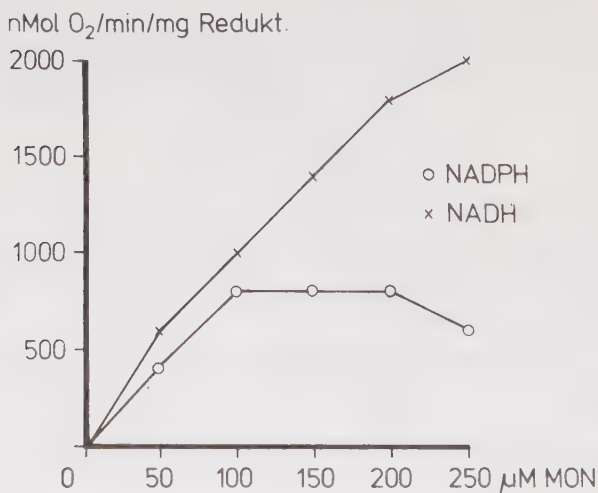


Abb. 10 Graphische Darstellung des O_2 -verbrauchs pro Minute und mg^2 -Reduktase in Abhängigkeit von der Menadion Konzentration. Die Küvette enthielt in 1 ml Mitopuffer 10 μg Reduktase, Menadion, 0.25 nMol cytochrom b_5 und:

x x x x 1 mM NADH
o o o o 1 mM NADPH

Tabelle 2

Veränderung des Redoxgrades von cytochrom b_5 bei der
durch NADH- b_5 -Reduktase katalysierten Oxidation von
NAD(P)H durch Menadion (Auswertung von Spektren)

	Küvetteninhalt in 1ml Mito- puffer	Redoxgrad	Atmungsgröße
		von cyt. b_5	nMol O_2 /min/mg
		b_5 red	
		b_5 red + b_5 ox	
1)	10 μ g Reduktase	0	0
	+ 0.25 nMol b_5 /ml	0	0
	+ 1mM NADH	1.000	0
	+ 50 μ M Menadion	0.784	600
	+ 200 μ M Menadion	0.487	2000
2)	10 μ g Reduktase	0	0
	+ 0.25 nMol b_5 /ml	0	0
	+ 1mM NADPH	1.000	0
	+ 50 μ M Menadion	0.338	400
	+ 200 μ M Menadion	0	600
3)	10 μ g Reduktase	0	0
	+ 0.25 nMol b_5 /ml	0	0
	+ 250 μ M Menadion	0	0
	+ 250 μ M NADH	1.000	2000
	+ 1250 μ M NADH	1.000	2000
4)	10 μ g Reduktase	0	0
	+ 0.25 nMol b_5 /ml	0	0
	+ 250 μ M Menadion	0	0
	+ 250 μ M NADPH	0	500
	+ 1250 μ M NADPH	0	800

Tabelle 3Wasserstoff-Fluß über die NADH-cyt. b_5 -Reduktase zu Menadion

	NADH	NADPH
Spezifische Ferricyanid- Reduktase Aktivität (ohne Menadion) U/mg	500	0
O ₂ -Verbrauch mit 250nMol Menadion und 0.25 nMol b_5 nMol O ₂ /min/mg Reduktase ⁵	2000	600
% Oxidation von 0.25nMol cytochrom b_5 durch 0.25mM Menadion nach vollständ. Reduktion d. NAD(P)H	51.3	100
Halbmaximale Hemmung des O ₂ -Verbrauchs durch Dicumarol 10 ⁻⁵ M	keine	4
Halbmaximale Hemmung des O ₂ -Verbrauchs durch A ² D P 10 ⁻⁴ M	keine	3
O ₂ -Verbrauch abhängig von der NAD(P)H Konzentr. bei konst. Menadion Menge	nein	ja

3.2.6 H₂O₂-Bildung bei der NAD(P)H-Atmung mit Menadion als Elektronenakzeptor

Zur Messung des bei der NAD(P)H-Oxidation entstehenden Wasserstoffperoxyds wurde dem Enzym-System Katalase (10 µg/ml) zugesetzt.

In der einen Versuchsreihe wurde Katalase erst zugesetzt, nachdem es in der Küvette zur Anoxie gekommen war (Tab. 4 Spalte 4). Bei der anderen Versuchsserie war Katalase schon vor Zugabe des Enzym-Systems in der Küvette (Tab. 4 Spalte 2).

Es wäre zu erwarten gewesen, daß 50 % des verbrauchten Sauerstoffs hätten wiedergewonnen werden müssen. Tatsächlich konnte nur eine O₂-Menge von max. 30 % beobachtet werden.

Tabelle 4

Vergleich der NAD(P)H-Atmung durch die NADH-cytochrom b_5 -Reduktase mit und ohne cytochrom b_5 Elektronenakzeptor war Menadion

	Atmungsgrösse nMol O_2 /min/mg Reduktase ohne Katalase	Atmungsgrösse nMol O_2 /min/mg Reduktase mit Katalase 3)	% scheinbare Verminderung der Atmungsgrösse 3) mit Katalase	O_2 entstanden in % des verbrauchten Sauerstoffs 4)
Gesamtes System 1)	2000	1500	25	23
System ohne b_5	1000	700	30	30
System mit NADPH ²⁾	800	600	12	22
System ohne b_5	800	600	12	20
System ohne Redukt.	0	0	0	0
System ohne Menadion	0	0	0	0

1) das gesamte System bestand aus 1mM NADH, 10 μ g Reduktase, 0.25 nMol t- b_5 , 250 μ M Menadion in 1 ml Mitopuffer pH 7.2

2) wie 1) jedoch statt 1mM NADH wurde 1mM NADPH verwendet

3) 10 μ g/ml Katalase waren vorgegeben

4) 10 μ g/ml Katalase wurden erst nach Anoxie zugegeben

3.3 Wirkung von Menadion auf andere FAD-Enzyme

3.3.1 Gesteigerter O_2 -Verbrauch mit Menadion und NADH durch die Lipoamid-Dehydrogenase

Die Lipoamid-Dehydrogenase aus Schweineherz, die hier verwendet wurde, katalysierte den Elektronenübergang zwischen NADH und Menadion. Wie aus Abb. 11 A zu ersehen ist, katalysierte dieses Enzym auch zu einem geringen Teil (76 nMol O_2 /min/mg Enzymprotein) den Übergang von Elektronen des NADH direkt auf O_2 , was schon von MASSEY (32) beschrieben wurde.

Die Menadionkonzentration, die eine Atmungssteigerung bewirkte, lag bei 30 μ M.

Bei der NADH Titration (Abb. 11B) mit konstanter Menge Menadion (250 μ M) war ab einer Konzentration von 0.75 mM NADH eine Atmungsabnahme zu beobachten. Dieses Verhalten beruhte wahrscheinlich auf der Tatsache, daß zunehmende NADH-Konzentration das Enzym zu hemmen vermag, wie es ebenfalls schon von MASSEY (32) festgestellt wurde.

Die Hemmstoffe Dicumarol, Antimycin A, Amytal, KCN und ADP hatten keinen Einfluß auf die NADH-Veratmung. Aufgrund seiner geringen Reaktion mit NADPH (32) von 1/100.000 der Reaktion mit NADH konnte eine Atmung mit Menadion und NADPH nicht beobachtet werden. Die Atmung mit NADPH hätte praktisch bei 5.38 pMol/min/mg liegen müssen, was mit der O_2 -Pt-Mikroelektrode nicht mehr meßbar war.

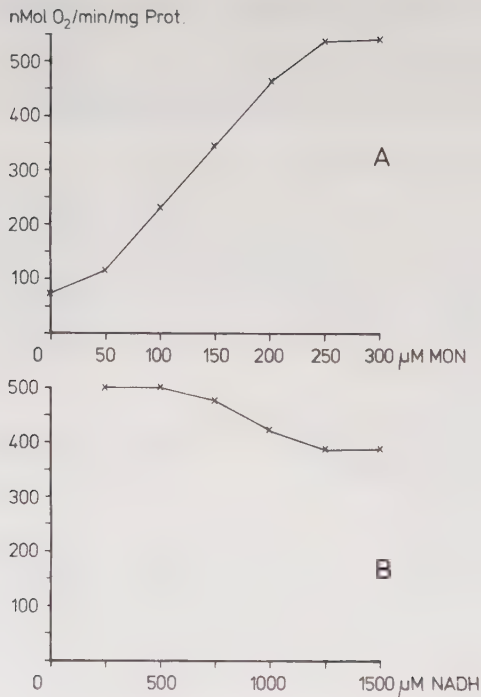


Abb. 11 Graphische Darstellung des O₂-Verbrauchs pro Minute und mg Lipoamid-Dehydrogenase in Abhängigkeit von der

Menadion Konzentration
bei 1 mM NADH (A)

NADH Konzentration
bei 250 μM Menadion (B)

Die Küvette enthielt in 1ml Mitopuffer 65 μg Lipoamid-Dehydrogenase und die übrigen Substanzen wie angegeben.

3.3.2 Gesteigerte NAD(P)H-Oxidation durch Xanthin- Oxidase mit Menadion als Elektronenakzeptor

Messungen an der Xanthinoxidase ergaben gleichfalls eine katalytische Wirkung auf die NADH und NADPH Oxidation in Gegenwart von Menadion. Der O_2 -Verbrauch bei Veratmung von NADPH war auch hier geringer, wie schon bei der isolierten NADH-cyt. b_5 Reduktase ausgeführt wurde. Abb. 12 zeigt dieses unterschiedliche Verhalten.

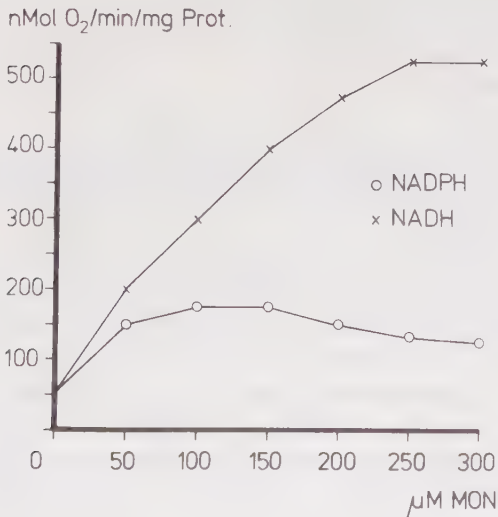


Abb. 12 Graphische Darstellung des O_2 -Verbrauchs pro Minute und mg Xanthinoxidase in Abhängigkeit von der Menadion Konzentration.

Die Küvette enthielt in 1ml Mitopuffer
1 mM NAD(P)H, 100 μg Xanthinoxidase und
Menadion

Die Hemmstoffe Amytal, Antimycin A, KCN und Dicumarol hatten keinen Einfluß auf die katalysierte Atmung. Die Autoxidation von 1mM NAD(P)H betrug 50 nMol O_2 /min/mg Xanthinoxidase, was der Tatsache Rechnung trug, daß die Xanthinoxidase auch direkt mit O_2 reagieren kann, wie ACKERMANN (1) und FRIDOVICH (18) zeigten.

Im Gegensatz zu dem Verhalten der b_5 -Reduktase, wo die Atmung mit NADH bis zu geringsten Konzentrationen unabhängig von dem Elektronendonator war, konnte mit steigenden Konzentrationen NADH bei der Xanthinoxidase auch eine Steigerung des O_2 -Verbrauchs registriert werden (Abb. 13).

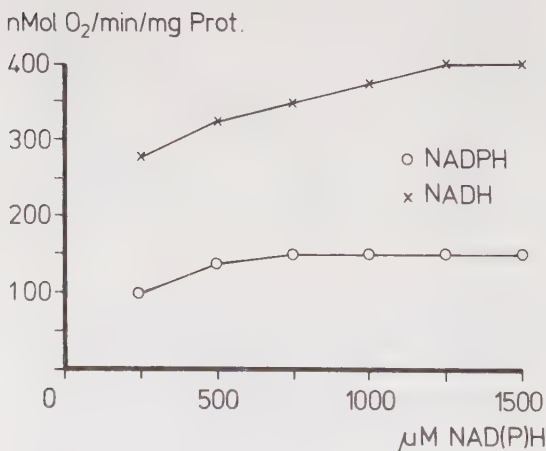


Abb. 13 Graphische Darstellung des O_2 -Verbrauchs pro Minute und mg XOD in Abhängigkeit von NAD(P)H bei 250 μM Menadion und 100 μg XOD in 1 ml Mitopuffer

Bei der NAD(P)H-Oxidation der Xanthinoxidase mit Menadion als Akzeptor entstand Wasserstoffperoxyd. Dabei ergaben die Untersuchungen im einzelnen folgendes Bild:

<u>Elektronendonator</u>	% O ₂ entstanden nach Katalase +)
NADPH	30
NADH	7

+) 10 µg/ml Katalase wurden zugegeben, wenn in der 1 ml Küvette Anoxie herrschte.

Wurde die Katalase vor dem Enzymsystem in die Küvette gegeben und die Reaktion dann mit NAD(P)H gestartet, so wurde der O₂-Verbrauch bei 1mM NADPH um 30 % und bei 1 mM NADH um 7% gehemmt.

3.3.3 NADPH-Oxidation durch die Glutathion-Reduktase mit Menadion als Elektronenakzeptor

Auch dieses FAD-Enzym katalysierte die Oxidation von NADPH bei Anwesenheit von Menadion. Die gefundenen Werte für den O₂-Verbrauch in Abhängigkeit von der Menadion Konzentration und der NADPH Konzentration sind den Abb. 14 und 15 zu entnehmen.

Oxidiertes Glutathion (GSSG) konnte die Reaktion der Glutathionreduktase mit 1mM NADPH und 250 µM Menadion zuerst um 50 % beschleunigen (Tab. 5). Eine weitere Titration mit GSSG führte jedoch zur Hemmung der Atmung.

Tabelle 5

Einfluß von oxidiertem Glutathion auf
die Atmung der Glutathionreduktase mit
NADPH und Menadion

Die Küvette enthielt in 1 ml Mitopuffer
50 µg Glutathionreduktase, 1mM NADPH,
250 µM Menadion und GSSG

Konzentration von GSSG in der Küvette (µM)	Atmungsgröße nMol O ₂ /min/mg GR
0	100
250	100
500	100
750	150
1000	100
1250	50
1500	0

Dieses Verhalten weist auf eine Reaktion des entstehenden
GSH (reduziertes Glutathion) mit Menadion hin, wie es schon
von NICKERSON (38) beschrieben wurde.

Wurde bei maximaler Atmung mit Menadion im System 10 µg/ml
Katalase zugesetzt, so konnten nur 30 % des verbrauchten
Sauerstoffs wiedergewonnen werden.

Die Tabelle 6 gibt einen Vergleich von Ferricyanid-
Reduktase Aktivitäten und Menadion-katalysierter Atmung
der hier untersuchten FAD-Enzyme und Zellorganellen
wieder.

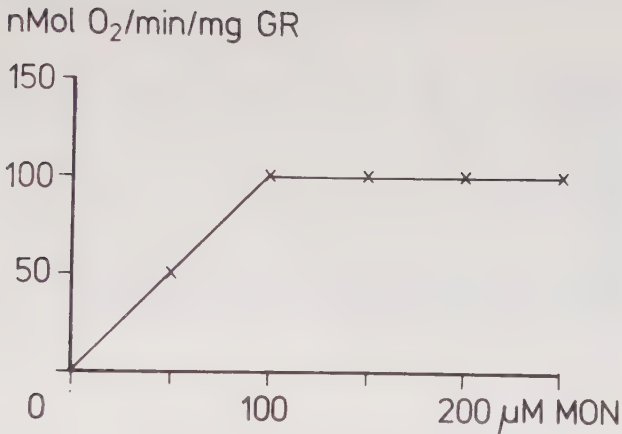


Abb. 14 Graphische Darstellung des O₂-Verbrauchs pro Minute und mg Glutathionreduktase in Abhängigkeit von der Menadion Konzentration

Die Küvette enthielt in 1 ml Mitopuffer
50 μg Enzym, 1 mM NADPH und Menadion

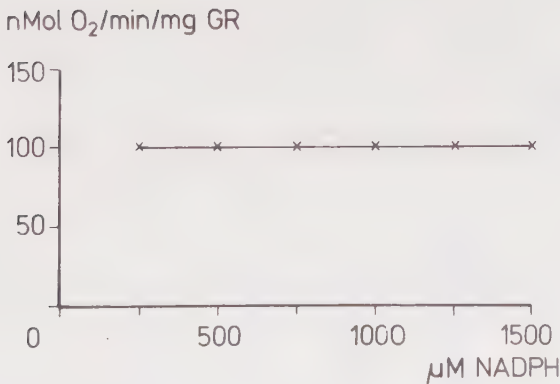


Abb. 15 Graphische Darstellung des O₂-Verbrauchs pro Minute und mg Glutathionreduktase in Abhängigkeit von der NADPH Konzentration

Die Küvette enthielt in 1 ml Mitopuffer
50 μg Enzym, 250 μM Menadion und NADPH

Tabelle 6

Gegenüberstellung der Ferricyanid-Reduktase-Aktivität mit der Menadion katalysierten Atmung einiger FAD-Enzyme und Zellorganellen

	Ferricyanid-Reduktase-Aktivität		Atmungsgrösse mit Menadion als Akzeptor nMol O ₂ /min/mg Prot NADH
	NADH	NADPH	
NADH-cyt. b ₅ -Reduktase aus Rattenlebermikro- somen EC 1.6.2.2	500	0	2000
Xanthinoxidase aus Kuhmilch EC 1.2.3.2	0.31	0.2	525
Glutathionreduktase aus Hefe EC 1.6.4.2	0	8.1	0
Lipoamid-Dehydrogenase aus Schweineherz EC 1.6.4.3	2	0	538
Mikrosomen	5.2	0.05	20.4
Mitochondrien	4.3	0	13.1
angereicherte Mitochondrienaus- samenmembran	22.4	0	65
			35

3.4 Menadion als Elektronenakzeptor bei der NADH und NADPH Oxidation durch Mikrosomen

Bei den spektrophotometrischen Messungen an Mikrosomen wurde cytochrom b_5 gleichsam als "Indikator" des Redox-grades der b_5 -Reduktase verwendet. Mit Dithionit reduziertes cytochrom b_5 ergab für Mikrosomen einen durchschnittlichen Gehalt von 0.4 nMol b_5 /mg Mikrosomenprotein. Die in den Versuchen verwendeten Konzentrationen von NADH (1mM) und NADPH (1mM) konnten cytochrom b_5 nur etwa zu 60 % reduzieren, was auf verschiedene Begleitreaktionen hinweisen dürfte.

Die Tabellen 7 und 8 geben einen Überblick über das unterschiedliche Verhalten bei der Oxidation von NADH und NADPH mit Menadion als Elektronenakzeptor.

Menadion rief bei Mikrosomen ebenfalls eine Oxidation von cytochrom b_5 hervor, und zwar um 44.4%, wenn NADH als Donator fungierte (Tab. 8 Nr. 1). Eine Oxidation des cytochroms von 93.8% wurde beobachtet, wenn NADPH verwendet wurde (Tab. 8 Nr. 2). Die im Vergleich zur isolierten NADH-cytochrom b_5 Reduktase etwas geringeren Prozentwerte bei der Oxidation von cytochrom b_5 (Tab. 2 Nr.1, 2) kamen wahrscheinlich dadurch zustande (Flußgeschwindigkeit umgekehrt proportional dem Redoxgrad) weil cytochrom b_5 in der mikrosomalen Membran möglicherweise ein anderes (positiveres?) Potential besitzt (62,25). Das würde auch erklären, warum bei mit Menadion inkubierten Mikrosomen NADPH noch eine geringfügige Reduktion von cytochrom b_5 zu wege bringt (Tab. 8 Nr. 4), während am isolierten Enzym-System keine Reduktion mehr gemessen werden konnte (Tab. 2 Nr. 4).

Tabelle 7Verhalten der Mikrosomen mit NADH und NADPH

	<u>NADH</u>	<u>NADPH</u>
Spezifische Ferricyanid-Reduktase- Aktivität U/mg	5.2	0.05
O ₂ -Verbrauch mit 0.25 mM Menadion und 1mM NAD(P)H nMol O ₂ /min/mg Mikr.Prot. 1)	20.4	10.2
% Oxidation des cyt.b ₅ durch 0.25 mM Menadion bei vorheriger Reduktion durch 1mM NAD(P)H 1)	44.4	93.8
Halbmaximale Hemmung des O ₂ -Verbrauchs durch Di- cumarol 10 ⁻⁵ M 2)	keine	20
Halbmaximale Hemmung des O ₂ -Verbrauchs durch ADP 10 ⁻⁵ M 2)	keine	80
K _{0,5} von NAD(P)H für O ₂ - Verbrauch in Gegenwart von 250 µM Menadion 10 ⁻⁶ M	< 50	≈ 250

1) die Küvette enthielt in 1ml Mitopuffer 1mM NAD(P)H,
2,2 mg Mikrosomenprotein
250 nMol Menadion

2) die Küvette enthielt in 1ml Mitopuffer wie 1) und
zusätzlich Hemmstoff

Bei den Kurven über den O_2 -Verbrauch (Abb. 16 A) fällt auf, daß hier die NADPH-Kurve im Gegensatz zur isolierten Reduktase (Abb. 10) die NADH-Kurve schneidet.

Dabei handelt es sich wahrscheinlich um die Mitreaktion der NADPH-cytochrom c Reduktase, von der eine Reaktion mit Menadion durch NISHIBAYASHI und SATO (39) beschrieben wurde.

Hemmbarkeit der NADPH-Veratmung mit Menadion als Akzeptor

Amytal, Antimycin A und KCN zeigten keinerlei Einfluß auf die NADH- und NADPH-Veratmung.

Die Hemmung der Atmung durch ADP und Dicumarol beschränkte sich auch hier nur auf die NADPH-cytochrom b_5 -Reduktase Aktivität der Mikrosomen mit Menadion als Akzeptor.

Im einzelnen kam es zu halbmaximaler Hemmung der Atmung durch 200 μM Dicumarol und 800 μM ADP.

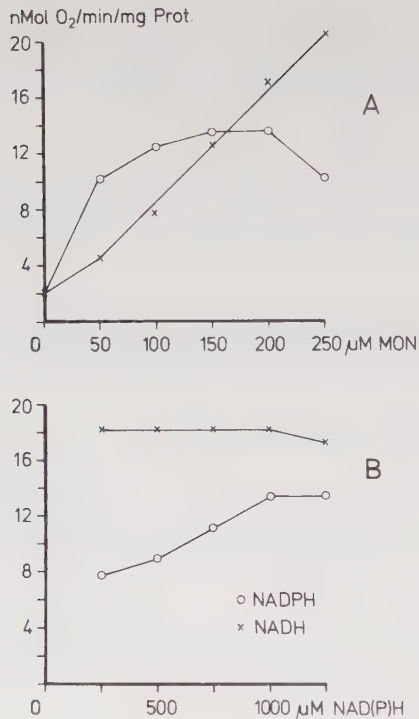


Abb. 16 Graphische Darstellung des O₂-Verbrauchs pro Minute und mg Mikrosomen-Protein in Abhängigkeit von der

Menadion Konzentration
bei 1mM NAD(P)H (A)

NAD(P)H Konzentration
bei 250 µM Menadion (B)

Die Küvette enthielt in 1ml Mitopuffer
2,2 mg Mikrosomen-Protein und die
übrigen Substanzen wie angegeben

Tabelle 8

Veränderung des Redoxzustandes von cytochrom b_5
bei der durch Mikrosomen katalysierten Oxidation
von NAD(P)H (Auswertung von Spektren)

Küvetteninhalt in 1ml Mito- puffer	[cyt b_5] Redoxgrad des cyt. b_5	= 0.44pM +) Atmungsgröße nMol O_2 /min/mg
1) 2.2 mg Mikrosomen- protein	-	0
+ 1 mM NADH	1.00	2.3
+ 50 μ M Menadion	0.76	4.5
+ 200 μ M Menadion	0.55	20.4
2) 2.2 mg M-protein	-	0
+ 1 mM NADPH	1.00	2.2
+ 50 μ M Menadion	0.63	10.2
+ 200 μ M Menadion	0.06	10.2
3) 2.2 mg M-Protein	-	0
+ 250 μ M Menadion	-	0
+ 250 μ M NADH	0.70	18.1
+1250 μ M NADH	0.70	17.0
4) 2.2 mg M-protein	-	0
+ 250 μ M Menadion	-	0
+ 250 μ M NADPH	0.20	7.9
+1250 μ M NADPH	0.40	13.6
+) Auswertung von Differenzspektren Wellenlängenbereich 520-620 nm und mit Philips x/y-Schreiber ausgeschrieben		

3.5 Wirkung von Menadion auf Mitochondrien

3.5.1 Allgemeines

3.5.1.1 Kopplung der Mitochondrien

Die bei diesen Experimenten verwendeten Mitochondrien waren stets gekoppelt. Der Atmungskontrollquotient betrug bei Veratmung von Glutamat (1mM) und Hydroxybutyrat (1mM) jeweils 3,5. Für Succinat war der ACQ 3.0.

3.5.1.2 Hemmbarkeit der mitochondrialen Atmung in state 1 durch Dicumarol

Dicumarol übte einen Hemmeffekt auf Mitochondrien in state 1 aus, obwohl kein Menadion anwesend war. 50%ige Atmungshemmung trat mit $2 \cdot 10^{-4}$ M Dicumarol auf. Gleichzeitig wurde spektrophotometrisch eine Oxidation des cytochrom b registriert. 2 mg/ml Rinderalbumin konnten die Hemmung wieder rückgängig machen. Cytochrom b wurde dann wieder reduziert.

3.5.2 Mitochondrien in state 1 ohne NAD(P)H

Auffällig war, daß schon Mitochondrien, die nur endogenes Substrat atmeten, auf Menadion reagierten. Nach Zugabe von 50 μ M Menadion kam es zu einer Atmungssteigerung um 100 %, die allerdings nur 2 Minuten anhielt und allmählich wieder auf den Wert vor der Menadiongabe zurückkehrte. Ein Nachstarten mit Menadion (50 μ M) konnte keine neuerliche Atmungssteigerung hervorrufen.

3.5.3 Mitochondrien in state 1 mit exogenem NAD(P)H

Endogenes Substrat atmende Mitochondrien konnten exogenes NADH und NADPH analog den Mikrosomen veratmen, wenn Menadion als Elektronenakzeptor wirkte. Die Tabelle 9 gibt eine Übersicht.

Abweichend vom Verhalten der Mikrosomen war jedoch bei der NADH-Veratmung der Mitochondrien mit Menadion keine Oxidation des reduzierten cytochrom b_5 , beim Einsatz von 50 μM Menadion (Tab. 9 Nr.1) und selbst 250 μM Menadion bewirkte nur eine Oxidation von maximal 10 % (Tab. 9 Nr.1). Die NADPH-Atmung ging andererseits mit einer vollständigen Oxidation des cytochrom b_5 einher, wenn 250 μM Menadion eingesetzt worden war (Tab. 9 Nr.2). Obwohl cytochrom b_5 in Mikrosomen und Mitochondrien weitgehend ähnlich sein soll, wie immunologische Studien zeigten (58, 46; 22), scheinen in der Reaktion der intakten Mitochondrien mit Menadion gewisse Unterschiede aufzutreten.

3.5.3.1 Unterschiedliches Verhalten der Mitochondrien mit NADH und NADPH

Der O_2 -Verbrauch bei der Veratmung von NADPH (Abb. 17) erreichte schon zu Anfang sein Maximum, wenn 50 μM Menadion zugegeben worden waren, und ließ sich durch weitere Menadiongabe nicht mehr steigern. Die Atmung flachte vielmehr immer ab.

NADH-Veratmung verhielt sich der bei den Mikrosomen beobachteten analog.

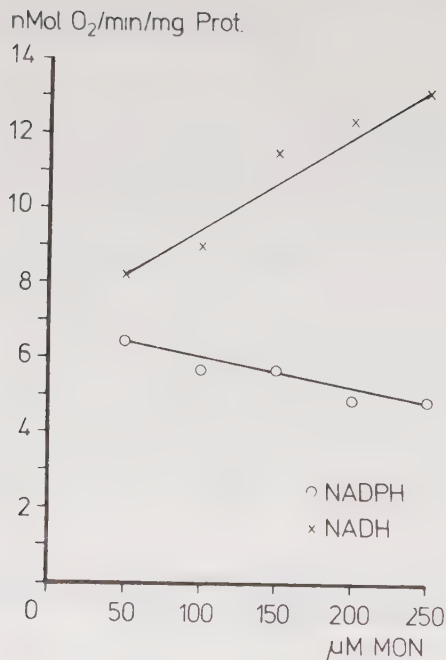


Abb. 17 Graphische Darstellung des O₂-Verbrauchs pro Minute und mg Protein in Abhängigkeit von der Menadion-Konzentration. Die Küvette enthielt in 1ml Mitopuffer 3,04 mg Mitochondrien-Protein, 1mM NAD(P)H und Menadion wie angegeben.

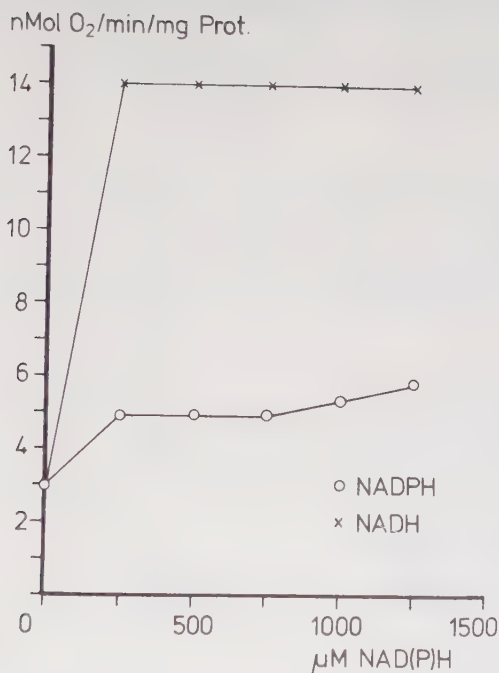


Abb. 18 Graphische Darstellung des O₂-Verbrauchs pro Minute und mg Protein in Abhängigkeit von der NAD(P)H-Konzentration. Die Küvette enthielt in 1ml Mitopuffer 3,04 mg Mitochondrien-Protein, 250 μM Menadion und NAD(P)H wie angegeben.

Tabelle 9

Veränderung des Redoxzustandes von cytochrom b_5
bei der durch Mitochondrien katalysierten
Veratmung von NAD(P)H (Auswertung von Spektren)

Küvetteninhalt in 1ml Mito- puffer	Redoxgrad von cyt. b_5 [cyt. b_5] = 0.048 nMol/mg	Atmungsgröße nMol O_2 /min/mg
1) 3.04 mg Mito- protein	-	0
+ 1mM NADH	1.00	0
+ 50 μ M Menadion	1.00	8.2
+ 200 μ M Menadion	0.90	13.1
2) 3.04 mg Mitop.	-	0
+ 1 mM NADPH	1.00	0
+ 50 μ M Menadion	0.50	6.5
+ 200 μ M Menadion	0.00	4.9
3) 3.04 mg Mitop.	-	0
+ 250 μ M Menadion	-	3
+ 250 μ M NADH	0.90	14
+1250 μ M NADH	0.90	14
4) 3.04 mg Mitop.	-	0
+ 250 μ M Menadion	-	3
+ 250 μ M NADPH	0.20	4.9
+1250 μ M NADPH	0.40	5.7

3.5.3.2 Hemmbarkeit der NADPH-Veratmung

Amytal, Antimycin A und KCN zeigten keinen Einfluß auf die NADH und NADPH Veratmung der Mitochondrien.

Dicumarol in Konzentrationen von $2 \cdot 10^{-4}$ M führte zu halbmaximaler Hemmung der NADPH-Veratmung mit Menadion als Akzeptor. Auf die NADH-Veratmung hatte es keine Hemmwirkung.

ADP konnte keinerlei Hemmwirkung bei der NADPH-Atmung zeigen, wobei zu berücksichtigen ist, daß die Atmung auch bei der nur in state 1 atmenden Mitochondrien durch ADP stimuliert werden kann. Ein etwaiger Hemmeffekt geht in dieser Atmungssteigerung unter, und ist nicht genau abzugrenzen.

3.5.4 Wirkung von Menadion auf Mitochondrien-Außenmembranen

3.5.4.1 NAD(P)H-Veratmung der MA mit Menadion als Akzeptor

Um eine Mitreaktion der mitochondrialen Enzyme der Innenmembran und des Matrixraumes mit Menadion auszuschließen, wurde Mitochondrien-Außenmembran präpariert (2.1.5) und angereichert. Einen Vergleich der ^NADH-Ferricyanid-Reduktase-Aktivitäten, des cytochrom b_5 -Gehaltes und der NADH-Menadion-Veratmung gibt Tabelle 10.

Spuren von cytochrom aa_3 und cytochrom cc_1 waren noch in der angereicherten Außenmembran vorhanden. Das elektronenoptische Bild (Abb. 1) zeigte jedoch weitgehend die Membranstruktur, die von SOTTOGASA (50) beschrieben wurde.

Tabelle 10

	U/mg spez.NADH- FeCy-Aktiv.	nMol/mg cytochrom b ₅	Atmungsgröße mit Menadion 250 µM nMol O ₂ /min/mg
Mitochondrien	4.3	0.048	13.1
angereicherte Mitochondrien- Außenmembran	22.4	0.3	65
Mikrosomen	5.2	0.2	20.4
b ₅ -Reduktase aus Mikrosomen	500	(0.25)	2000

Daß eine Anreicherung um das 5fache stattgefunden hatte, spiegeln sowohl die NADH-Ferricyanid-Aktivität, der cytochrom b₅-Gehalt und die Atmungsgröße mit Menadion wieder (Tab. 10).

Das Verhalten der angereicherten Mitochondrien-Außenmembran zeigte weitgehend Übereinstimmung mit dem der Mikrosomen und der isolierten b₅-Reduktase. (Abb. 19)

War bei intakten Mitochondrien noch die Nichtoxidation des cytochrom b₅ nach 50 µM Menadion auffällig gewesen (Tab.9 Nr.1), so konnte hier bereits eine 22.7 %ige Oxidation gemessen werden, die sich mit 200 µM Menadion auf 45.4 % steigern ließ. (Tab. 13 Nr.1) NADH 1mM war bei dieser Reaktion Elektronendonator. An MA wurden 0.5 mg Protein eingesetzt.

Im Vergleich zu den intakten Mitochondrien ist auch der kleinere Quotient zwischen NADH-Atmung und NADPH-Atmung hervorzuheben (Tab. 11). Bei dieser Betrachtung scheint ebenfalls die Tatsache zum Ausdruck zu kommen, daß Enzyme des Matrixraumes oder der Innenmembran der Mitochondrien mit Menadion reagieren können.

Weder Mitochondrien noch MA entwickelten O_2 aus H_2O_2 bei der NAD(P)H-Atmung mit Menadion, wenn 10 $\mu\text{g/ml}$ Katalase zugegeben wurden. Das ist verständlich, da Mitochondrien bereits Katalase enthalten (8) ebenso wie Mikrosomen (59).

Tabelle 11

	Atmungsgröße mit 250 μM Menadion und 1mM NADH 1mM NADPH nMol O_2 /min/mg		Quotient <u>Atmung mit NADH</u> Atmung mit NADPH
Mitochondrien	13.1	4.9	2.67
angereicherte Mitochondrien- Außenmembran	65	35	1.85
Mikrosomen (zum Vergleich)	20.4	10.2	2.00

3.5.4.2 Hemmbarkeit der NADPH-Atmung

Amytal, Antimycin A und KCN hatten keinen Einfluß auf die NADH- und NADPH-Veratmung mit Menadion als Akzeptor. 200 μM Dicumarol bewirkte halbmaximale Hemmung der NADPH-Veratmung.

500 μM ADP hemmte die Atmung mit NADPH zu 50%. Dicumarol und ADP hatten keine Wirkung auf die NADH-Veratmung der MA mit Menadion als Akzeptor.

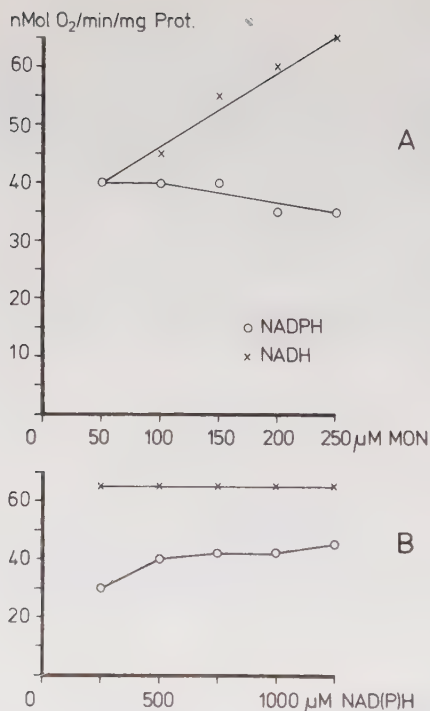


Abb. 19 Graphische Darstellung des O_2 -Verbrauchs pro Minute und mg MA-Protein² in Abhängigkeit von der

Menadion Konzentration
bei 1 mM NAD(P)H (A)

NAD(P)H Konzentration
bei 250 μM Menadion (B)

Die Küvette enthielt in 1ml Mitopuffer
0.5 mg MA-Protein und die übrigen
Substanzen wie angegeben

Tabelle 12Verhalten der angereicherten Mitochondrien-Außenmembran
mit den Elektronendonatoren NADH und NADPH

	NADH	NADPH
spezifische Ferricyanid-Reduktase Aktivität U/mg	22.4	0
Sauerstoffverbrauch mit 250 nMol Menadion nMol O ₂ /min/mg Protein	65	35
Oxidation des mitoch.cyt.b ₅ nach vorheriger Reduktion ¹⁾ durch NAD(P)H (0.3 nMol b ₅ /mg reduziert)	45.4%	76.4%
50% Hemmung des O ₂ -Verbrauchs durch Dicumarol nMol 2)	--	200
50% Hemmung des O ₂ -Verbrauchs durch ADP nMol 2)	--	500
50% Hemmung des O ₂ -Verbrauchs durch Antimycin A ²⁾ µg/ml	keine Hemmung	
Abhängigkeit des O ₂ -Ver- brauchs von der Menge NAD(P)H bei konstanter Menadion Konz.	nein	ja

- 1) die Küvette enthielt in 1ml Mitopuffer 1mM NAD(P)H,
0.5 mg MA-Protein, 250 nMol Menadion
- 2) die Küvette enthielt in 1ml Mitopuffer wie 1) und zusätzlich
den Hemmstoff

Tabelle 13

Veränderung des Redoxzustandes von cytochrom b_5 bei der
durch angereicherte Mito-Außenmembran katalysierten
Oxidation von NAD(P)H mit Menadion als Elektronenakzeptor

Küvetteninhalt in 1 ml Mito- puffer	Redoxgrad von cyt. b_5 [cyt. b_5] $\pm$ $\frac{0.33 \text{ nMol}}{\text{mg}}$	Atmungsgröße nMol O_2 /min/mg
1) 0.5 mg MA-Protein	-	0
+ 1 mM NADH	1.00	10
+ 50nMol Menadion	0.77	40
+200nMol Menadion	0.54	65
2) 0.5 mg MA-Protein	-	0
+ 1 mM NADPH	1.00	0
+ 50nMol Menadion	0.61	40
+200nMol Menadion	0.23	35
3) 0.5 mg MA-Protein	-	0
+ 250 nMol Menadion	-	0
+ 250 nMol NADH	0.9	65
+1250 nMol NADH	0.9	65
4) 0.5 mg MA-Protein	-	0
+ 250 nMol Menadion	-	0
+ 250 nMol NADPH	0.21	30
+1250 nMol NADPH	0.42	45

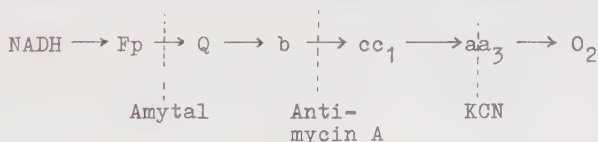
3.5.5 Mitochondrien mit gehemmter Atmungskette

3.5.5.1 Hemmstoff KCN

Wurden Mitochondrien in state 1 mit KCN (1mM) gehemmt, so kam die Atmung zum Stillstand und 250 μ M Menadion führte zu einer Oxidation von cytochrom b (Abb. 21 Kurve 2). Gleichzeitig mit der Oxidation von cytochrom b setzte O_2 -Verbrauch ein (Abb. 20). Zugabe von Succinat (2mM) steigerte den Sauerstoffverbrauch (Abb. 20) und cytochrom b wurde wieder teilweise reduziert (Abb. 21 Kurve 3). Malonat (2 mM) hemmte den O_2 -Verbrauch vollständig und bewirkte wieder Oxidation von cytochrom b (Abb. 21 Kurve 4).

3.5.5.2 Hemmstoffe Amytal, Antimycin A und KCN

Wurden die Mitochondrien in state 1 nacheinander an den drei bekannten Stellen der Atmungskette gehemmt:



entstanden die typischen Spektren (Abb. 23); Amytal führt zur Oxidation aller Cytochrome (Kurve 1), Antimycin A Hemmung ist stärker als die Amytalhemmung, so daß cytochrom b reduziert wird (Kurve 2), schließlich hemmt KCN cytochrom aa_3 , so daß durch die Leckstellen der vorigen Hemmstellen fließende Elektronen cytochrom cc_1 und aa_3 reduzieren können. Voraussetzung für die vollständige Reduktion in state 1 ist, daß genügend endogenes Substrat vorhanden ist (Kurve 3). Die Atmung kam vollständig zum Erliegen (Abb. 22).

Wurde nun Menadion (250 μM) eingesetzt, so war wieder eine Oxidation des cytochrom b zu sehen (Abb. 24 Kurve 1) und gleichzeitig setzte O_2 -Verbrauch ein (Abb. 22). Die Atmung mit Menadion kam jedoch nach kurzer Zeit wieder zum Stillstand.

Erst auf 2 mM Succinat ließ sich der O_2 -Verbrauch erneut in Gang bringen (Abb. 22), wobei cytochrom b im Spektrum (Abb. 24 Kurve 2) eine leichte Reduktion zeigte.

Malonat (2 mM) hemmte die Atmung vollständig und führte zu einer erneuten Oxidation von cytochrom b (Abb. 24 Kurve 3).

Abb. 25 Kurven 1-3 zeigen nochmals denselben Hemmvorgang mit Amytal, Antimycin A und KCN.

Menadion (250 μM) brachte das schon oben geschilderte Verhalten, nämlich die Oxidation von cytochrom b (Abb. 26 Kurve 1) und den gleichzeitig einsetzenden O_2 -Verbrauch, der langsam wieder abnahm (Abb. 27).

α - Glycerophosphat (2mM) führte zu erneutem Sauerstoffverbrauch und Reduktion von cytochrom b (Abb. 26 Kurve 2). Diese Reaktion ließ sich nicht mit Malonat hemmen (Abb. 27). Dicumarol konnte jedoch die Atmung mit α - Glycerophosphat vollständig hemmen (Abb. 28).

Daß dieses Verhalten der Mitochondrien mit Menadion nicht auf einer direkten Reaktion mit KCN beruhen konnte, beweist Abb. 28, wo derselbe Vorgang wie oben beschrieben ohne KCN untersucht wurde.

Um eine Oxidation von cytochrom b nach 250 μM Menadion zu bekommen, war es also notwendig, entweder Antimycin A oder KCN einzusetzen.

Nur mit Amytal gehemmte Mitochondrien zeigten keine zusätzliche Oxidation von cytochrom b mit Menadion. Andere Substrate, die getestet wurden (Pyruvat, Malat, Glutamat, Hydroxybutyrat) zeigten, wenn sie statt Succinat oder α - Glycer-

phosphat verwendet wurden, keine Reaktion, d.h. es kam weder zur Atmungssteigerung noch zu nennenswerter Auswirkung auf den Redoxgrad des cytochrom b.

ADP (0.2 mM) hatte keinen stimulierenden Effekt auf die Atmung dreifach gehemmter Mitochondrien mit Menadion als Akzeptor (vgl. 2.5.5.2).

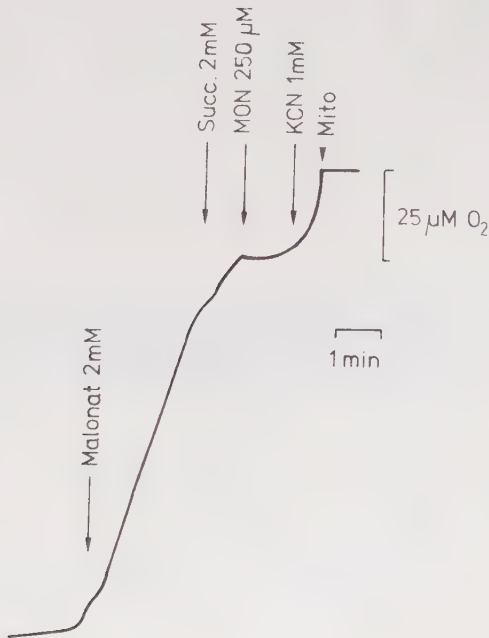


Abb. 20 Graphische Darstellung des O₂-Verbrauchs von Mitochondrien (2.07 mg Mitochondrienprotein) Hemmung der Atmungskette mit KCN. Die Küvette enthielt in 1 ml Mitopuffer die Substanzen wie in der Zeichnung angegeben.

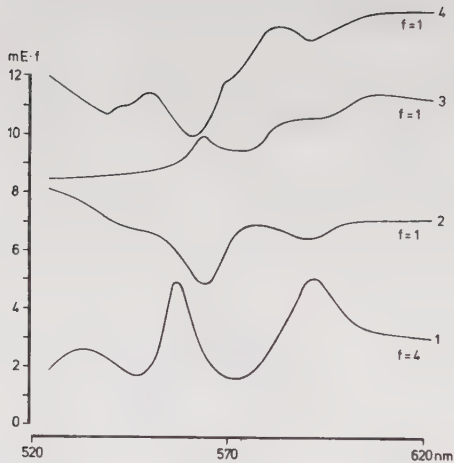


Abb. 21 Differenzspektren im Wellenlängenbereich 520-620 nm aufgenommen mit FABRI-TEK und auf Philips x/y-Schreiber ausgeschrieben. Die Küvette enthielt in 1ml 2.07 mg Mitochondrienprotein und die Substanzen

Kurve 1	KCN 1 mM
Kurve 2	Menadion 250 μ M
Kurve 3	Succinat 2 mM
Kurve 4	Malonat 2 mM

cytochrom aa_3 0.35 nMol/mg Protein (19;26;60)
 cytochrom cc_1 0.36 nMol/mg Protein (26;60)

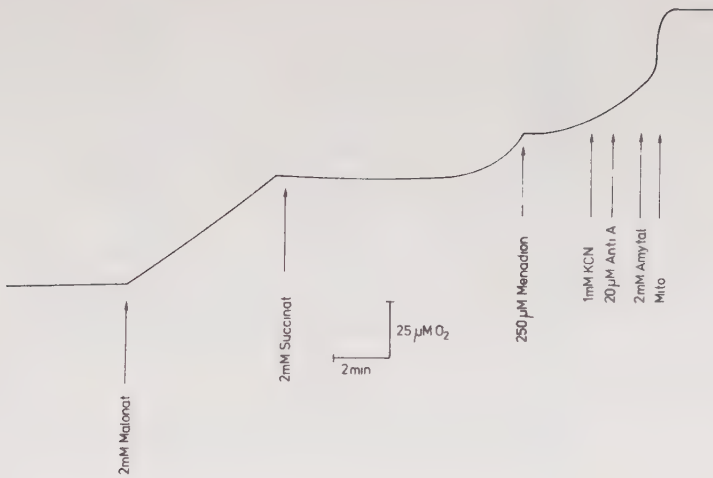


Abb. 22 Graphische Darstellung des O_2 -Verbrauchs der Mitochondrien. Die Kuvette enthielt in 1 ml Mitopuffer 2.45 mg Mitochondrienprotein und die Substanzen wie angegeben.

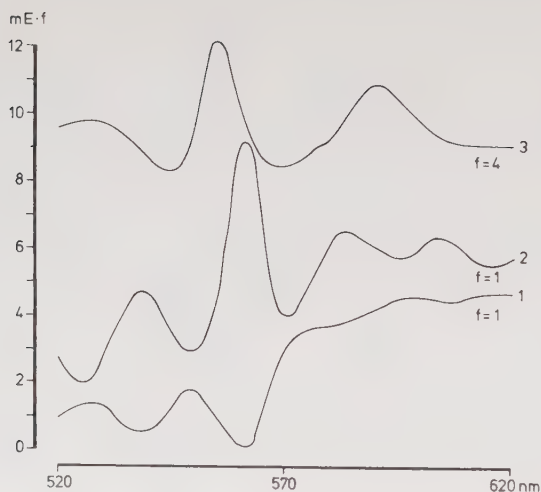


Abb. 23 Differenzspektren im Bereich 520-620 nm.
Die Küvette enthielt in 1ml Mitopuffer
2.45 mg Mitochondrienprotein und

Kurve 1 2 mM Amytal

Kurve 2 20 μ M Antimycin A

Kurve 3 1 mM KCN

cytochrom aa_3 0.24 nMol/mg Protein

cytochrom b 0.1 nMol/mg Protein

cytochrom cc_1 0.35 nMol/mg Protein

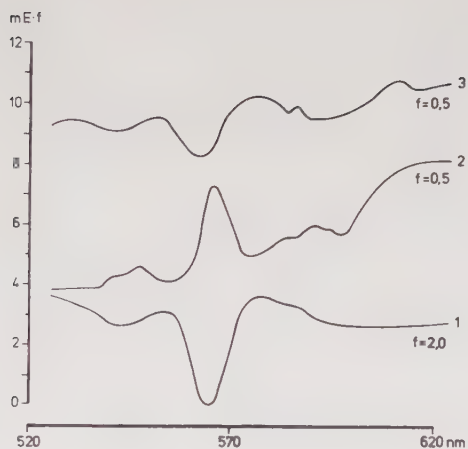


Abb. 24 Differenzspektren im Bereich 520-620 nm
Fortsetzung des Versuches aus Abb. 23

Kurve 1	250 μ M Menadion
Kurve 2	2 mM Succinat
Kurve 3	2 mM Malonat

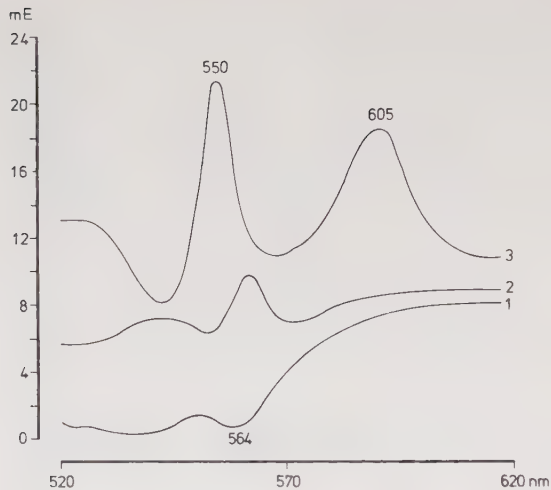


Abb. 25 Differenzspektren im Bereich 520-620 nm
 Die Küvette enthielt in 1ml Mitopuffer 1.97 mg
 Mitochondrienprotein und

Kurve 1	2 mM Amytal	
Kurve 2	20 μ M Antimycin A	cyt.b 0.1 nMol/mg
Kurve 3	1 mM KCN	cyt.aa ₃ 0.24
		cyt.cc ₁ 0.33

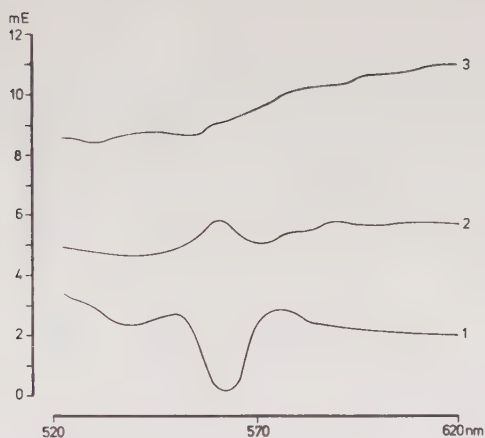


Abb. 26 Differenzspektren im Bereich 520-620 nm
 Fortsetzung des Versuches aus Abb. 25
 Kurve 1 250 μ M Menadion
 Kurve 2 2 mM α -Glycerophosphat
 Kurve 3 2 mM Malonat

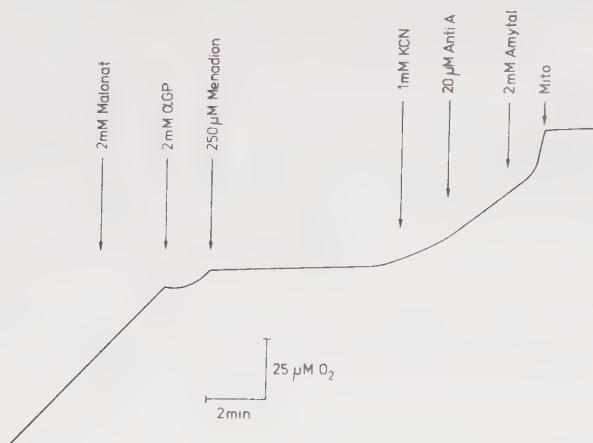


Abb. 27 Graphische Darstellung des O_2 -Verbrauchs
 Die Kuvette enthielt in 1 ml Mitopuffer
 1.97 mg Mitochondrienprotein und die Sub-
 stanzen wie angegeben

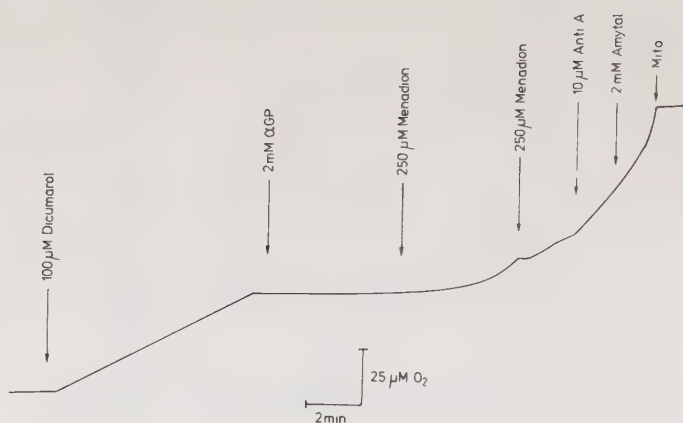


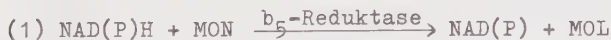
Abb. 28 Graphische Darstellung des O_2 -Verbrauchs der Mitochondrien.
Die Küvette enthielt in 1 ml Mitopuffer 2.11 mg Mitochondrienprotein und die Substanzen wie in der Zeichnung angegeben

4. Diskussion

Spektrophotometrische und polarographische Experimente mit der isolierten NADH-cytochrom b_5 -Reduktase lassen keinen Zweifel daran, daß dieses Enzym einen Elektronenübergang von NADH und NADPH auf Menadion katalysiert. Nach Beobachtungen von TAKESUE (57) hat die b_5 -Reduktase eine NADPH-cytochrom b_5 Aktivität (etwa 1/300 der NADH- b_5 - Aktivität) von 0.4 U/mg, die sich nicht durch Antikörper, die gegen die NADPH-cyt. c Reduktase gewonnen wurden, hemmen ließ. OMURA (40) beschrieb zwar für die isolierte NADPH-cyt.c Reduktase eine geringfügige Reaktion mit cyt. b_5 von 0.03 U/mg (was 1/1300 der NADPH-cyt.c Aktivität entspricht), doch konnte IYANAGI (23), der beide Enzyme untersuchte, beim letzteren keine Reaktion mit cytochrom b_5 feststellen.

Entgegen den Befunden von IYANAGI (23), der nur eine äußerst geringe Reaktion der b_5 -Reduktase mit Menadion beschrieb und den Angriffspunkt am cytochrom b_5 vermutete, konnte ich eine deutlich meßbare NADH- und NADPH Veratmung der b_5 -Reduktase mit Menadion als Elektronenakzeptor registrieren (Abb. 7).

Da die verwendete b_5 -Reduktase frei von NADPH-cyt.c Aktivität und frei von cytochrom b_5 war, könnte die Wechselwirkung von Menadion mit der Reduktase und den Elektronendonatoren NAD(P)H etwa nach folgenden Gleichungen beschrieben werden:



Bezüglich des Angriffspunktes von Menadion wären folgende Mechanismen zu diskutieren:

(I) Nach STRITTMATTER (53, 54) besitzt die b_5 -Reduktase im aktiven Zentrum ein FAD-Molekül und eine SH-Gruppe (Abb.29)

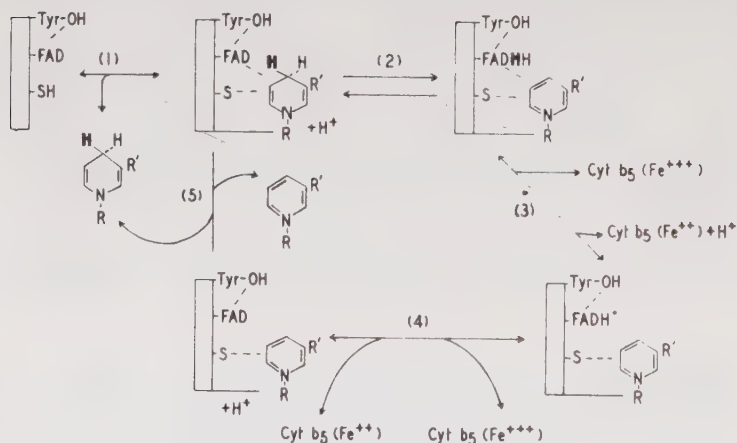


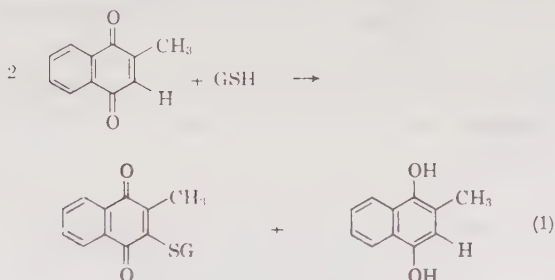
Abb. 29 Modell des aktiven Zentrums der b_5 -Reduktase nach STRITTMATTER (53)

Wie NICKERSON et al (38) am reduzierten Glutathion zeigen konnte, kann Menadion mit SH-Gruppen zu einem 3-Tioäther reagieren. Deshalb wäre eine Reaktion der SH-Gruppen der b_5 -Reduktase mit Menadion denkbar nach dem in Abb. 30 angegebenen Schema.

Experimente in dieser Richtung konnten dies jedoch bis jetzt nicht bestätigen. Denn die bei meinen Untersuchungen eingesetzte Menge Enzym ($10 \mu g = 0.3 \text{ nMol}$) würde bei 3 SH-Gruppen/Mol Enzym (54) etwa 1 nMol SH-Gruppen entsprechen.

Folgt man nun nach NICKERSON (38), daß dieselbe Menge Menadion (1 nMol) mit diesen Gruppen reagiert, dann würden nach Abb. 30 0.5 nMol Menadion in die Thioätherform überführt und 0.5 nMol Menadion zu Menadiol reduziert. Durch Autoxidation von Menadiol könnten dann maximal 0.5 nMol O_2 verbraucht werden.

Anaerobically:



On aeration:

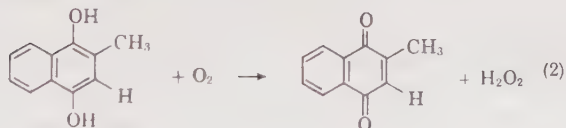


Abb. 30 Reaktion von Menadion und Glutathion zu Thiodion und Menadiol nach NICKERSON et al (38)

Tatsächlich wurde O_2 katalytisch und nicht stöchiometrisch verbraucht mit 10 nMol O_2 /min/10 μ g Reduktase. Daher entfällt diese Hypothese.

(II) Es wäre eine Reaktion am FAD-SH-Komplex der Reduktase in dem Sinne möglich, wie sie von NAKAMURA und YAMAZAKI (35) an der Lipoamid-Dehydrogenase beobachtet wurde, wo mit Menadion zwischenzeitlich (Abb. 31) ein charge-transfer complex vorkommen soll, der das physiologisch aktive Zwischenprodukt der Reaktion an der Lipoamid-Dehydrogenase darstellt.

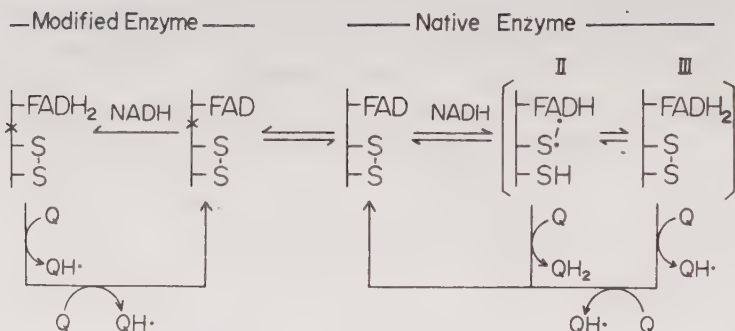


Abb. 31 Mögliche Rolle der Disulfid-Gruppe im aktiven Zentrum der Lipoamid-Dehydrogenase bei der Reaktion mit Chinonen (=Q) nach NAKAMURA und YAMAZAKI (35)

(III) Möglicherweise könnte es verschiedene spezifische Bindungsstellen an der b₅-Reduktase für NADH und NADPH geben, ähnlich wie sie bei der Xanthinoxidase für NADH und Xanthin von NAKAMURA und YAMAZAKI (36) gefunden wurden.

Das unterschiedliche Verhalten der b₅-Reduktase zeigt, daß NADH besser durch Menadion oxidiert werden kann. Diese Atmung ließ sich durch cytochrom b₅ noch beschleunigen, so daß die Reaktion sowohl an der Reduktase als auch am cytochrom b₅ ablaufen muß. Auf die Veratmung von NADPH hatte cytochrom b₅ dagegen keinen Einfluß. Die Hemmbarkeit der Atmung durch Dicumarol und ADP konnte wiederum nur bei der NADPH-Oxidation beobachtet werden. In diesem Zusammenhang muß erwähnt werden, daß ich für die Xanthinoxidase noch zusätzlich eine Reaktion mit NADPH beobachten

konnte (Abb. 12,13), und es somit eine dritte Bindungsstelle an der Xanthinoxidase geben könnte. Bemerkenswert war dabei eine Analogie zur b_5 -Reduktase dergestalt, daß die NADPH-Atmung (Abb. 10,12) mit Menadion als Akzeptor ebenfalls geringer war als die mit NADH. Die Hypothesen (II) und (III) sind also für die b_5 -Reduktase beizubehalten.

(IV) Eine Inaktivierung der b_5 -Reduktase durch Menadion ist unwahrscheinlich. Die Tatsache, daß nach Hypothese (I) keine Atmung auftrat, wenn das Enzym mit Menadion inkubiert war, wohl aber, wenn NADH oder NADPH zugegeben wurde (Tab. 2 Nr. 3,4) spricht dagegen, daß Menadion das Enzym schädigt. Die unterschiedliche Oxidation von cytochrom b_5 durch 250 μ M Menadion (Tab. 2 Nr. 1,2), je nachdem NADH oder NADPH verwendet wurde, könnte allerdings der Ausdruck eines unspezifischen Effektes von Menadion an der Bindungsstelle des cytochroms mit der Reduktase sein. Die im Laufe des Experimentes (Abb. 10) auftretende Aktivitätsabnahme ist nur von der NADPH-Konzentration abhängig und nicht von der Zeit. Auch nach 15 Minuten Inkubation der b_5 -Reduktase mit Menadion trat keine Aktivitätsabnahme auf.

H_2O_2 -Bildung bei der NAD(P)H-Veratmung

Würde die Reaktion an der Reduktase nur so verlaufen, daß



geben, wie NICKERSON (38) und IYANAGI (23) fordern, so müßten 50 % des verbrauchten O_2 wiedergewonnen werden, wenn dem System Katalase zugegeben wird.

Katalase konnte jedoch nur maximal 30 % des verbrauchten Sauerstoffs wiederbringen (Tab. 4), während IYANAGI (23) eine O_2 -Entstehung von 50 % registrierte.

Diese Unterschiede in den Ergebnissen legen den Schluß nahe, daß

1. die Reduktase eine gewisse Katalase-Aktivität besitzen könnte bzw. durch minimale Spuren von Katalase verunreinigt ist,
2. eine Teilreaktion

$2 \text{ MOL} + O_2 \longrightarrow 2 \text{ MON} + 2 \text{ H}_2O$

abläuft. Denn auch hier bietet sich eine Analogie zur Xanthinoxidase an, bei der sowohl Ein- als auch Zwei-Elektronenübergänge zur selben Zeit beobachtet wurden (37).

Die Dicumarol-Hemmung (Tab. 3) der Reduktase wurde schon 1958 (47) beschrieben. Damals sprach man zwar von Diaphorase Aktivität der Mitochondrien und Mikrosomen, doch 1967 bestätigten SOTTOCASA et al (50) an der reinen b_5 -Reduktase und Mitochondrienaußenmembran diese Angaben von RAW und MAHLER. Dabei fand man, daß das mitochondriale Enzym empfindlicher auf Dicumarol ansprach (halbmaximale Hemmung mit $2 \cdot 10^{-4} M$ Dicumarol) als das mikrosomale. Diese Hemmung wurde damals bei NADH-Ferricyanid-Reduktase Aktivität beobachtet. In meinen Untersuchungen konnte ich nur eine Hemmung der NADPH-Atmung und nicht der NADH-Atmung mit Menadion als Elektronenakzeptor feststellen. Die Aufhebung der Dicumarol-Hemmung durch Rinderalbumin dürfte darauf beruhen, daß Rinderalbumin Dicumarol bindet, wie es für Farben, z.B. Eosin, 5-Aminoacridin und Fluoreszein beschrieben wurde (29).

Die Dicumarol-Hemmung beweist, daß die b_5 -Reduktase frei von NADPH-cyt.c Reduktase Aktivität ist, da letztere durch Dicumarol nicht hemmbar war (39).

Die divergierenden Befunde mit Ferricyanid und Menadion lassen vermuten, daß Ferricyanid und Menadion verschiedene Angriffspunkte haben. Offen bleibt, welchen Angriffspunkt cytochrom b_5 hat, d.h. welche Testmethode die Aktivität der b_5 -Reduktase besser wiedergibt.

Adenosindiphosphat (ADP) hemmt die NADH-Ferricyanid-Reduktase Aktivität der b_5 -Reduktase, wie STRITTMATTER (54) fand. Die in dieser Arbeit beschriebene Hemmung der NADPH-Veratmung der Reduktase mit Menadion als Akzeptor durch ADP muß wohl auf demselben Mechanismus beruhen.

Von besonderem Interesse dürfte die hier erstmalig beobachtete Hemmung der NAD(P)H-Atmung durch Antimycin A sein. Zwar konnte STRITTMATTER (51) keine Hemmung der Reduktase -cyt. b_5 - Reaktion durch Antimycin A (10-50 $\mu\text{g/ml}$) feststellen, aber in dem von STRITTMATTER verwendeten Testansatz war cytochrom b_5 anwesend.

Die von mir beobachtete Hemmung bezieht sich aber ausschließlich auf die Reaktion der b_5 -Reduktase mit Menadion und NAD(P)H, aber ohne cytochrom b_5 .

Welche Aussagen über die Antimycin A Hemmung der Atmungskette durch Vergleich der Hemmwirkung möglich sind, bleibt einer weiterführenden Arbeit vorbehalten.

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß die Hemmung durch Dicumarol, ADP und Antimycin A für einen spezifischen Angriffsort von Menadion an der b_5 -Reduktase sprechen.

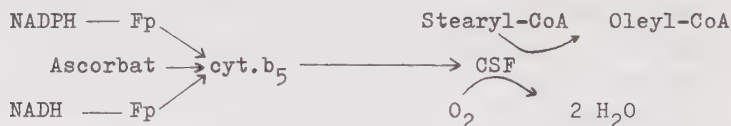
Mikrosomen

Als SATO (48) bei Mikrosomen NADPH in Gegenwart von Menadion oxidieren konnte, beobachtete er einen O_2 -Verbrauch der Reaktion. 1969 beschrieb NISHIBAYASHI (39) die Reaktion der NADPH-cyt.c Reduktase mit Menadion und erklärte damit die von SATO beschriebene "Vitamin K_3 -

abhängige NADPH-Oxidase". 1972 fand WILLS (63) eine Hemmung der Lipidperoxidation von Mikrosomen durch Menadion, wenn er NADPH oder Ascorbat als Elektronendonatoren verwendete. WILLS stellte dabei eine Hemmung des O_2 -Verbrauchs fest. An dieser Stelle sei auch nochmals auf die von IYANAGI beschriebene Reaktion der b_5 -Reduktase mit p-Benzochinon hingewiesen (23).

Die von mir gemachten Untersuchungen an Lebermikrosomen können die Experimente von NISHIBAYASHI und IYANAGI dahingehend bestätigen, daß ein gesteigerter O_2 -Verbrauch bei der NAD(P)H-Oxidation mit Menadion als Akzeptor beobachtet wurde.

Legt man das von OSHINO und SATO (41) vorgeschlagene Reaktionsmodell in Mikrosomen zugrunde, ergibt sich folgendes Bild:



Geht man davon aus, daß die b_5 -Reduktase Menadion zu Menadiol reduziert und dabei NAD(P)H verbraucht, müßte notwendigerweise eine Hemmung aller Vorgänge, die an den Cytochrom b_5 Elektronenfluß gebunden sind, beobachtbar sein.

Daß WILLS (63) sowohl die Hemmung der Lipidperoxidation als auch der Demethylierung (via P_{450}) durch Menadion beobachtete, wenn NADPH als Elektronendonator verwendet wurde, würde obige Überlegung bestätigen.

Außerdem reagiert Menadion direkt mit Ascorbat unter Sauerstoffverbrauch (Abb. 5,6). Damit wäre die von WILLS gemachte Beobachtung der Menadion-Hemmung bei der Lipidperoxidation so zu interpretieren, daß der Elektronen-

donator Ascorbat direkt oxidiert wird und nicht mehr für die Lipidperoxidation zur Verfügung steht. Vielleicht spielt dieser Mechanismus bei der bekannten Schutzwirkung von Ascorbat gegen die Entstehung von cancerogenen Nitrosaminen aus Nitrit und Arzneimitteln (z.B. Aminopyrin) eine Rolle. Wie polarographische und spektrophotometrische Messungen an den Mikrosomen ergaben, wird die Oxidation von NADH und NADPH mit Menadion als Akzeptor weitgehend (wie unten aufgeführt) von der mikrosomalen NADH-cyt. b_5 Reduktase katalysiert.

Was das verschiedene Verhalten der Mikrosomen (Tab. 7,8) mit NADH und NADPH angeht, so müssen zwei unterschiedliche Reaktionen diskutiert werden:

(I) Sowohl NADH als auch NADPH führen zu einer Reduktion des cytochrom b_5 , was in Übereinstimmung mit den an der isolierten Reduktase gemachten Beobachtungen war. Ferner decken sich die Ergebnisse bei den Mikrosomen mit denen an der isolierten Reduktase im Hinblick auf die Oxidation von cytochrom b_5 , wenn Menadion als Elektronenakzeptor eingesetzt wurde. Während bei der NADH-Atmung cytochrom b_5 nur bis etwa 45% oxidiert wurde, wurde bei der NADPH-Veratmung 100% des cytochroms oxidiert. Ob dieses Verhalten flußbedingt oder potentialbedingt war, konnte nicht geklärt werden. Es ist daher anzunehmen, daß die vollständige Oxidation des cyt. b_5 durch die geringe NADPH-Dehydrogenase Aktivität bedingt war.

(II) Die in dieser Arbeit beschriebene NADPH-Atmung durch Mikrosomen mit Menadion als Elektronenakzeptor kann nur zum Teil auf der NADPH-cyt.c Reduktase beruhen, da dieses Enzym nicht durch Dicumarol (0.2 mM) hemmbar ist (39),

hier jedoch eine Hemmung der Atmung durch Dicumarol festgestellt wurde. Dazu kommt, daß die NADPH-cyt.c Reduktase nicht mit cytochrom b_5 direkt reagiert (23), wohl aber, wenn reduziertes Menadion unter anaeroben Bedingungen anwesend ist, denn Menadiol kann dann Elektronen auf das cytochrom b_5 übertragen. Vielleicht kann unter diesem Gesichtspunkt die, wenn auch geringe, Reduktion des cytochrom b_5 (Tab. 8 Nr. 4) durch NADPH in Gegenwart von Menadion erklärt werden. Der isolierten b_5 -Reduktase fehlte nämlich dieses Verhalten, dort blieb cytochrom b_5 weiter oxidiert (Tab. 2 Nr. 4).

Denkbar wäre aber auch, daß das membrangebundene cytochrom b_5 in den Mikrosomen ein anderes Potential (25; 62) als das isolierte besitzt und auch bei Menadion Vorgabe noch in geringem Umfang reduzierbar ist.

Alles in allem ist das Verhalten der Mikrosomen mit NADH und NADPH sowie Menadion als Elektronenakzeptor weitgehend dem der isolierten b_5 -Reduktase analog. Die Hemmung der Atmung durch ADP und Dicumarol weisen auf die NADPH-cyt. b_5 Aktivität der b_5 -Reduktase hin.

Mitochondrien

Die verschiedenen Membranräume der Mitochondrien (Außenmembran, Intermembranspace, Innenmembran und Matrix) weichen in ihrem Aufbau und ihrer Funktion wesentlich voneinander ab und sind die Orte einer Fülle von Enzymen. Im Zusammenhang mit dieser Arbeit seien hier nur die NADH-cyt. b_5 -Reduktase (50) und das cytochrom b_5 (33) herausgegriffen, die beide in der Außenmembran der Mitochondrien lokalisiert sind.

Menadion führte bei Mitochondrien in state 1 zu vermehrtem O_2 -Verbrauch, der jedoch allmählich wieder abnahm. Demnach mußten bestimmte mitochondriale Enzyme Elektronen auf Menadion übertragen haben und Menadiol dann durch Autoxidation Sauerstoff verbraucht haben.

Zwei dieser Enzyme wurden von IYANAGI isoliert und untersucht. Im einzelnen handelt es sich dabei um die

NADH-Dehydrogenase (EC 1.6.99.3)

DT-Diaphorase (EC 1.6.99.2),

die beide eine NADH-Oxidation mit Menadion als Akzeptor katalysieren (24).

Exogenes NADH und NADPH konnte von Mitochondrien oxidiert werden, wenn Menadion als Akzeptor wirkte. Sowohl NADH als auch NADPH führten zu einer Reduktion von cytochrom b_5 . (Tab. 9 Nr. 1,2)

Im Gegensatz jedoch zu den Befunden an Mikrosomen und isolierter b_5 -Reduktase aus Mikrosomen, wo Menadion das durch NADH reduzierte cytochrom b_5 bis zu 50% oxidierte, wurde das durch NADH reduzierte cytochrom b_5 der Mitochondrien durch 250 μ M Menadion zu maximal 10% oxidiert. Durch NADPH reduziertes cytochrom b_5 reagierte auf Menadion in der von Mikrosomen und b_5 -Reduktase bekannten Weise. Dieses Verhalten ist damit zu erklären, daß nach IYANAGI (24) die NADH-Dehydrogenase unter endogenem NADH-Verbrauch Menadion reduziert und dieses entstandene Menadiol dann seinerseits cytochrom b_5 reduzieren könnte. Geht man also davon aus, daß das endogene NADH durch die NADH-Dehydrogenase und die DT-Diaphorase oxidiert wird unter Reduktion von Menadion, so würde sich die Auswirkung auf den Redoxgrad

des cytochroms b_5 die Waage halten, weil die Oxidation durch Angriff an der NADH-cyt. b_5 Reduktase mit einer Reduktion (Menadiol Entstehung durch die beiden Dehydrogenasen) kompensiert wäre.

Die Mitwirkung der beiden Dehydrogenasen bei diesem Vorgang konnte insofern wahrscheinlich gemacht werden, als angereicherte Mitochondrien-Außenmembran ein der isolierten b_5 -Reduktase völlig analoges Verhalten zeigte, d.h. eine Oxidation von cytochrom b_5 (Tab. 13) weil die Wasserstoffzufuhr über die Dehydrogenasen wegfiel.

Ein weiterer Hinweis auf die Mitreaktion dieser beiden Dehydrogenasen gibt das Verhältnis der Atmungen mit NADH und NADPH. Der Quotient dieser Atmungen (Tab. 11) war für intakte Mitochondrien 2,67, für die MA aber nur 1,85.

Die NADPH-Veratmung durch Mitochondrien in Gegenwart von Menadion war der an der isolierten b_5 -Reduktase analog. Offenbar spielt die DT-Diaphorase, die sowohl NADPH als auch NADH oxidieren kann, eine untergeordnete Rolle, zumal dieses Enzym vorwiegend im Cytosol vorkommt (12,13).

Die Hemmstoffe Dicumarol und ADP, die auf die b_5 -Reduktase und die Mikrosomen eine Wirkung gezeigt hatten, beeinflussten ebenfalls die NADPH-Atmung in den Mitochondrien und der Mitochondrien-Außenmembran. Als Erklärung gilt das dort Gesagte.

Die Tatsache, daß zwei FAD-Enzyme der Mitochondrien, nämlich die NADH-Dehydrogenase und die DT-Diaphorase mit Menadion reagieren können (24), liegt wohl einem Teil

der Ergebnisse zugrunde, die ich an Mitochondrien mit gehemmter Atmungskette machte.

So erklärt sich der O_2 -Verbrauch durch Zugabe von Menadion bei vollständig gehemmter Atmungskette (Abb. 22) weitgehend daraus, daß die NADH-Dehydrogenase direkt mit Menadion unter Sauerstoffverbrauch reagiert und zwangsläufig ein "Leerlaufen" der Atmungskette im Bereich zwischen Amytal-Hemmung und NADH-Dehydrogenase erfolgt. Allerdings ist diese Erklärung nur dann zulässig, wenn die Hemmung durch Amytal vollständig ist, was mit einer Konzentration des Hemmstoffes von 2 mM der Fall gewesen sein müßte, da die halbmaximale Hemmung für Amytal $5 \cdot 10^{-4} M$ beträgt.

Darüberhinaus erscheint es mehr als wahrscheinlich, daß Menadion außer an den zwei durch IYANAGI (24) untersuchten Enzymen auch noch an den FAD-Enzymen Succinat-Dehydrogenase und α -Glycerophosphat-Dehydrogenase, die beide Elektronen bei cytochrom b in die Atmungskette einspeisen, angreift. Denn die polarographischen Experimente (Abb. 22, 27) zeigten, wie nach Zugabe von α -Glycerophosphat oder Succinat die Atmung trotz vollständig gehemmter Atmungskette wieder einsetzte.

Als Stütze meiner Hypothese kann die Untersuchung von MAROSVARI (30) gelten, der eine Steigerung der Succinat-Dehydrogenase Aktivität mit Menadion (600 $\mu g/ml$) feststellte. Eine Hemmung beobachtete er, wenn Menadion in kleineren Konzentrationen eingesetzt wurde. Die von mir eingesetzten Konzentrationen (43 $\mu g/ml$) entsprechen diesen Befunden.

Für die Reaktion von Menadion mit der Succinat-Dehydrogenase spricht nach meinen Ergebnissen auch die Hemmung dieses Vorganges durch Malonat in stöchiometrischem Verhältnis (Abb. 22).

Die α -Glycerophosphat-Oxidase war dagegen nicht durch Malonat sondern nur durch Dicumarol hemmbar (Abb. 27 und 28).

Erwähnenswert ist, daß auch die Succinat-Dehydrogenase SH-Gruppen aufweist, die bei der Reaktion mit künstlichen Elektronenakzeptoren eine Rolle spielen sollen (43).

Im zweiten Teil der Diskussion sollen Befunde diskutiert werden, die auch unter medizinischen Aspekten interessant erscheinen.

Nach den in dieser Arbeit vorgelegten Untersuchungen katalysiert auch das FAD-Enzym Glutathion-Reduktase die Oxidation von NADPH mit Menadion als Elektronenakzeptor. Bei dem geringen aeroben Stoffwechsel der Erythrozyten von $2,5 \mu\text{Mol CO}_2/\text{Stunde}/10^{11}$ Erythrozyten dürfte diese Oxidation von weitreichender Bedeutung sein, zumal NADPH wahrscheinlich noch von der in den Erythrozyten nachgewiesenen NADH-cyt. b_5 -Reduktase (44,45) durch Menadion oxidiert werden kann.

WALLER et al (61) berichteten, daß es bei Glutathion-Reduktase-Mangel und Gabe von Naphthochinonen zur klinischen Manifestation des Enzymdefektes kommt. Der Heinz-Körper-Test war bei den Defektträgern dann stets stark pathologisch.

Für die durch Vitamin K_3 Gabe ausgelösten hämolytischen Anämien bei Frühgeborenen (2) dürfte der Mechanismus weitgehend durch die Untersuchungen von MEZICK (34) aufgeklärt worden sein. Er bewies, daß Menadion einen spezifischen SH-Gruppen Inhibitor darstellt, der die Erythrozytenmembran so verändert, daß die Permeabilitätsänderung zur Hämolyse führt. Außerdem stellte er fest, daß Menadion das Hämoglobin zu Methämoglobin oxidiert und den intrazellulären Gehalt der Erythrozyten an reduziertem Glutathion senkt.

Nimmt man an, daß die von PASSON (44, 45) in Erythrozyten beschriebene NADH-cyt. b_5 Reduktase, die Methämoglobin-Reduktase ist, wie PASSON vorschlug, dann stimmen die oben gemachten Feststellungen von MEZICK gut mit der in dieser Arbeit beschriebenen Beobachtung überein, daß die b_5 -Reduktase die Oxidation von NAD(P)H durch Menadion katalysiert, was den verminderten Gehalt an reduziertem GSH erklärt. Ergänzend muß allerdings gesagt werden, daß Menadion GSH auch direkt oxidieren kann (38).

Biologisch wichtig scheint auch die Wirkung von Menadion auf die Cholesterin-Synthese zu sein. OZAWA (42) fand bei Menadiongabe zu Leberhomogenaten eine geringere Synthese von Squalen und ein Sistieren der Folgeprodukte Lanosterin und Cholesterin. Als Erklärung hierfür bietet sich an, daß erstens NADPH aus dem Syntheseweg abgezogen wird (durch NADH-cyt. b_5 -Reduktase? NADPH-cyt.c Reduktase? Compartment?) und zweitens der O_2 -abhängige Schritt vom Squalen zu den Folgeprodukten durch relative Zell-Anoxie unterbrochen wird, weil der Sauerstoff bei der Menadiol-Autoxidation verbraucht wird.

Die bei Candida Mykose (21) beschriebene Toxizitätssteigerung durch Menadion ist auch auf dem Hintergrund der hier vorgelegten Ergebnisse nicht erklärbar.

Es zeigt sich aber, daß aus dem Einsatz von Menadion als Hilfsmittel zur Untersuchung oxidativer Stoffwechselwege sich neben den biochemischen Einblicken wichtige Befunde der Toxizität des Chinons ergeben.

Bestehen bleibt die Frage nach der immer wieder diskutierten physiologischen Bedeutung von Menadion: Ob eventuell die Autoxidation zur Beseitigung überschüssigen Wasserstoffs sinnvoll ist, oder ob der Einsatz von Menadion z.B. zur Hemmung der Cholesterinsynthese therapeutisch einsetzbar wäre, müssen weitere Arbeiten in dieser Richtung klären.

Auch bei der Hemmung der NADPH-Atmung durch ADP erhebt sich die Frage, ob es sich dabei um einen Rückkopplungsmechanismus handeln könnte, der NADPH nur solange beseitigt, bis das Energieniveau der Mitochondrien wieder Substrat zur Energiegewinnung benötigt.

5. Zusammenfassung

Die Frage nach der Beteiligung der FAD-Enzyme an der Menadion-katalysierten Atmung in der Zelle konnte dahingehend beantwortet werden, daß

- (1) die mikrosomale und mitochondriale NADH-cytochrom b_5 Reduktase die Veratmung von NADH und NADPH mit Menadion als Akzeptor katalysiert,
- (2) Menadion (250 μ M), das durch 1mM NADH reduzierte cytochrom b_5 in Gegenwart von b_5 -Reduktase (Mikrosomen, Mitochondrien) ca. 50%, und das durch 1 mM NADPH reduzierte cytochrom b_5 ca. 100 %, oxidiert,
- (3) die NAD(P)H-Veratmung der b_5 -Reduktase mit Menadion als Akzeptor (und ohne cytochrom b_5 im System) durch Antimycin A hemmbar ist,
- (4) die NADH-Veratmung der b_5 -Reduktase mit Menadion sich durch cytochrom b_5 auf das Doppelte steigern läßt,
- (5) bei der NAD(P)H-Veratmung der Reduktase mit MON als Akzeptor, die SH-Gruppen im aktiven Zentrum der b_5 -Reduktase wahrscheinlich eine Rolle spielen,
- (6) die NADPH-Atmung der b_5 -Reduktase (Mikrosomen, Mitochondrien) durch Dicumarol und ADP hemmbar ist,
- (7) die Autoxidation des an der b_5 -Reduktase gebildeten Menadiol wahrscheinlich auf zwei Wegen verläuft; unter O_2 -Verbrauch einmal zu H_2O_2 , und zum anderen zu H_2O ,
- (8) die FAD-Enzyme Succinat-Dehydrogenase und α -Glycerophosphat-Oxidase mit Menadion reagieren,
- (9) die Xanthinoxidase und die Glutathionreduktase NADPH oxidieren in Gegenwart von Menadion.

Summary:

Answers regarding the question of FAD-enzymes taking part in the menadione-catalysed respiration in the cell could be found as follows:

- (1) the microsomal and mitochondrial NADH-cytochrome b_5 -reductase catalyses the oxidation of NADH and NADPH with menadione as acceptor;
- (2) menadione (250 μ M) oxidizes approx. 50% of cytochrome b_5 , which was reduced by 1mM NADH in the presence of b_5 -reductase (microsomal, mitochondrial), and approx. 100% with 1mM NADPH as electron donator;
- (3) the NAD(P)H-Oxidation of the b_5 -reductase with menadione as acceptor (without any cytochrome b_5 in the system) was inhibited by Antimycin A;
- (4) the NADH Oxidation of the b_5 -reductase with menadione as acceptor showed an increase by 100% on adding cytochrome b_5 to the system;
- (5) the NAD(P)H-Oxidation of the b_5 -reductase with menadione as acceptor is probably due to the SH-groups in the active centre of the enzyme;
- (6) the NADPH-Oxidation of the b_5 -reductase (microsomal, mitochondrial) was inhibited by Dicoumarol and ADP;
- (7) probably two reactions describe the autoxidation of menadiol generated at the b_5 -reductase: one by reducing oxygen to H_2O_2 , the other by producing H_2O only;
- (8) the FAD-enzymes Succinic-Dehydrogenase and α -Glycerophosphate-Oxidase react with menadione;
- (9) Xanthine-Oxidase and Glutathione-Reductase oxidize NADPH in the presence of menadione.

6. Abkürzungen

ADP	Adenosindiphosphat
b ₅ -Reduktase	NADH-cytochrom b ₅ Reduktase
d-b ₅	detergentien isoliertes cytochrom b ₅
t-b ₅	trypsin isoliertes cytochrom b ₅
MA	Mitochondrien-Außenmembranen
MON	Menadion, 2-Methyl-1,4-Naphthochinon
MOL	Menadiol, reduziertes Menadion
NADH	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid, reduziert
NADPH	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat, reduziert

7. Literaturverzeichnis

1. Ackermann, E. and Brill, A.S.
Magnetic and Spectrophotometric studies of the
Kinetics of the Catalysis of Xanthine oxidation
by Xanthin Oxidase from Cow's Milk
Biochim.Biophys. Acta, 56 (1962) 397
2. Allison, A.C., Moore, T. and Sharmann, M.I.
Haemolysis and Haemoglobinuria in Vitamin E
Deficient Rats after Injections of Vitamin K
Substitutes
Brit.J.Haematol.2 (1956) 197
3. Beisenherz, G., Boltze, H.J., Bücher, Th., Czok, R.,
Garbade, K.H., Meyer-Arendt, E., Pfeleiderer, G.
Diphosphofructose-Aldolase, Phosphoglyceraldehyd-
Dehydrogenase, Milchsäure-Dehydrogenase, Glycero-
phosphat-Dehydrogenase und Pyruvat-Kinase aus
Kaninchenmuskulatur in einem Arbeitsgang
Zeitschr.f.Naturf. 8b (1953) 555
4. Brauser, B.
Ein Gerät zur höchstempfindlichen Differential-
spektrophotometrie mit dem RapiDspektroskop
Z.f.Analyt.Chem. 237 (1968) 8
5. Brauser, B.
Ein Verfahren zur Differenzspektrophotometrie
mit einem Instrumentenrechner
41. Kolloquium des SFB 51, 1973
6. Brauser, B.
BC 1410 pO₂-Meter
Bio-Cal Instruments GmbH, Gräfelfing
7. Chance, B.
Rapid and Sensitive Spectrophotometry.
The Stepped Flow Method for the Measurements
of the Reaction Kinetics and Spectra of Unstable
Compounds in the Visible Region of the Spectrum
Rev.Sci.Instr. Vol. 22, No.8 (1951) p.619
8. Chance, B. and Oshino, N.
Kinetics and Mechanisms of Catalase in Peroxisomes
of the Mitochondrial Fraction
Biochem.J., 122 (1971) 225

9. Chance, B. and Williams, G.R.
Respiratory Enzymes in Oxidative Phosphorylation.
II. Difference Spectra
J.Biol.Chemistry 217 (1955) 395
10. Chance, B. and Hess, B.
Metabolic Control Mechanisms
I. Electron Transfer in the Mammalian Cell
J.Biol. Chemistry 234 (1959) 2404
11. Colpa-Boonstra, J.P. and Slater, E.C.
The possible Role of Vitamin K in the
Respiratory Chain
Biochim.Biophys.Acta, 27 (1958) 122
12. Conover, T.E., Danielson, L. and Ernster, L.
DT Diaphorase
III. Separation of mitochondrial DT Diaphorase
and Respiratory Chain
Biochim.Biophys.Acta, 67 (1963) 254
13. Conover, T.E. and Ernster, L.
DT Diaphorase
IV. Coupling of extramitochondrial reduced
Pyridine Nucleotide Oxidation to mitochondrial
Respiratory Chain
Biochim.Biophys.Acta, 67 (1963) 268
14. Dam, H.
The Antihaemorrhagic Vitamin of the Chick
Nature, 135 (1935) 652
15. D'Ans-Lax
Taschenbuch für Chemiker und Physiker
Band I, Springer Verlag, 1967, S. I-1205
16. Ernster, L., Danielson, L. and Ljunggren, M.
DT Diaphorase
I. Purification from soluble Fraction of Rat
Liver Cytoplasm, and Properties
Biochim.Biophys.Acta, 58 (1962) 171
17. Fieser, L.F.
The Chemistry of Vitamin K
Annals of Internal Medicine, 15 (1941) 648
18. Fridovich, I. and Handler, P.
Xanthinoxidase
V. Differential Inhibition of the Reduction
of various Electron Acceptors
J.Biol.Chemistry, 237 (1962) 916

19. Van Gelder, B.F.
On Cytochrome c Oxidase
I. The Extinction coefficients of cytochrome a
and cytochrome a₃
Biochim.Biophys.Acta, 118 (1966) 36
20. Gleichmann, U. und Lübbers, D.W.
Die Messung des Sauerstoffdruckes in Gasen
und Flüssigkeiten mit der Pt-Elektrode unter
besonderer Berücksichtigung der Messung im Blut
Pfl.Arch.f.d.ges.Physiol. 271 (1960) 431
21. Haufe, F.
Die Wirkung des Vitamin K₃ auf die experimentelle
Candida-Mykose
Mykosen, 10 (1967) 73
22. Ito, A.
Hepatic Sulfite Oxidase Identified as Cytochrome
b₅-like Pigment Extractable from Mitochondria by
Hypotonic Treatment
J. Biochem. 70 (1971) 1061
23. Iyanagi, T. and Yamazaki, I.
One-Electron-Transfer Reactions in biochemical
Systems
III. One-Electron Reduction of Quinones by micro-
somal Flavin Enzymes
Biochim.Biophys.Acta, 172 (1969) 370
24. Iyanagi, T. and Yamazaki, I.
One-Electron-Transfer Reactions in biochemical
Systems
V. Difference in the mechanism of Quinone Reduction
by the NADH Dehydrogenase and the NAD(P)H Dehydrogenase
(DT-Diaphorase)
Biochim.Biophys.Acta, 216 (1970) 282
25. Kawai, Y., Yoneyama, Y., Yoshikawa, H.
The Oxidation-Reduction Potential of Cytochrome b₅
in soluble and particulate form with reference to
the Role of Lipid
Biochim.Biophys.Acta, 67 (1963) 522
26. Klein, F.
Die respiratorischen Komponenten der Leber
Inaugural-Dissertation, 1973, Med.Fak. München
27. Klingenberg, M.
Pigments of Rat Liver Microsomes
Arch.Bioch.Biophys. 75 (1958) 376

28. Kortüm, G.
Lehrbuch der Elektrochemie,
Verlag Chemie, 1966, S. 420 ff.
29. Laurence, D.J.R.
A study of the Adsorption of Dyes on Bovine
Serum Albumin by the Method of Polarization of
Fluorescence
Biochem. J., 51 (1952) 168
30. Marosvari, I., Tanka, B. and Keller, M.
Effect of Vitamin K₂ on Human and Rat
Renocortical Succinicdehydrogenase Activity
Acta Medica Acad. Scient. Hung., Tomus 28 (1),
1971, p. 47
31. Masters, B.S.S., Bilimoria, M.H. and Kamin, H.
The Mechanism of 1-and 2-Electron Transfers
Catalyzed by Reduced Triphosphopyridine
Nucleotide Cytochrome c Reductase
J.Biol.Chemistry, 240 (1965) 4081
32. Massey, V.
Lipoyl Dehydrogenase
The Enzymes, Academic Press, New York and London,
1963, Vol. 7, p. 286 - 291
33. Mayer, G., Ullrich, V. and Staudinger, H.
Possible Involvement of Cytochrome b₅ in
L-Kynurenine-3-Hydroxylase of Rat Liver Mitochondria
Hoppe-Seyler's Z.Physiol. Chem. 349 (1968) 459
34. Mezick, J.A., Settlemyre, C.T., Brierley, G.P.,
Barefield, K.P., Jensen, W.N. and Cornwell, D.G.
Erythrocyte Membrane Interactions with Menadione
and the Mechanism of Menadione-induced Hemolysis
Biochim.Biophys.Acta, 219 (1970) 361
35. Nakamura, M. and Yamazaki, I.
One-Electron Transfer Reactions in biochemical
Systems
VI. Changes in Electron Transfer Mechanisms of
Lipoamide Dehydrogenase by Modification of Sulf-
hydryl Groups
Biochim.Biophys.Acta, 267 (1972) 249
36. Nakamura, M. and Yamazaki, I.
One-Electron Transfer Reactions in biochemical
Systems
VII. Two Types of Electron Outlets in Milk
Xanthine Oxidase
Biochim.Biophys.Acta, 327 (1973) 247

37. Nakamura, S. and Yamazaki, I.
One-Electron Transfer Reactions in biochemical Systems
IV. A Mixed Mechanism in the Reaction of Milk Xanthine Oxidase with Electron Acceptors
Biochim.Biophys.Acta, 189 (1969) 29
38. Nickerson, W.J., Falcone, G. and Strauss, G.
Studies on Quinone-Thioethers.
I.Mechanism of Formation and Properties of Thiodione
Biochemistry, Vol. 2, No. 3 (1963) 537
39. Nishibayashi-Yamashita, H. and Sato, R.
Vitamin K₂-dependent NADPH Oxidase of Liver Microsomes
J. Biochem. 67 (1970) 199
40. Omura, T. and Takesue, S.
A New Method for Simultaneous Purification of Cytochrome b₅ and NADPH-cytochrome c Reductase from Rat Liver Microsomes
J. Biochem. 67 (1970) 249
41. Oshino, N. and Sato, R.
The Dietary Control of the Microsomal Stearyl CoA Desaturation Enzyme System in Rat Liver
Arch.Bioch.Biophys. 149 (1972) 369
42. Ozawa, H. and Ichikawa, H.
Studies on Inhibitors of Cholesterol Biosynthesis.
III. Sites of Inhibition of Cholesterol Biosynthesis by 1,1'-Decamethylenediguanidine Dihydrochloride, Vitamin K₂ and 2-Methyl-3,6-dibromo-1,4-benzoquinone in the Rat Liver Homogenates
Yakugaku Zasshi, 91 (1971) 187
43. Pagani, S., Bonomi, F., Cerletti, P.
Sulphydryl and Disulfide Content of Succinate Dehydrogenase
FEBS Letters, 39 (1974) 139
44. Passon, P.G. and Hultquist, D.E.
Soluble Cytochrome b₅ Reductase from Human Erythrocytes
Biochim.Biophys. Acta, 275 (1972) 62

45. Passon, P.G., Reed, D.W. and Hultquist, D.E.
Soluble Cytochrome b_5 from Human Erythrocytes
Biochim.Biophys. Acta, 275 (1972) 51
46. Raftell, M. and Orrenius, S.
Preparation of Antisera against Cytochrome b_5
and NADPH-Cytochrome c Reductase from Rat Liver
Microsomes
Biochim.Biophys.Acta, 233 (1971) 358
47. Raw, I. and Mahler, H.R.
Studies of Electron Transport Enzymes
III. Cytochrom b_5 of pig liver mitochondria
J.Biol.Chem. 234 (1959) 1867
48. Sato, R., Nishibayashi, H., Omura, T.
Naphthoquinone-dependent oxidation of reduced
triphosphopyridine nucleotide by liver microsomes
Biochim.Biophys. Acta, 63 (1962) 550
49. Schneider, W.C.
Intracellular Distribution of Enzymes
III. The Oxidation of Octanoic Acid by
Rat Liver Fractions
J.Biol. Chemistry, 176 (1948) 259
50. Sottocasa, G.L., Kuylenstierna, B., Ernster, L.
and Bergstrand, A.
An Electron-Transport System associated
with the outer Membrane of Liver Mitochondria
J.Cell Biology, 32 (1967) 415
51. Strittmatter, P. and Velick, S.F.
A Microsomal Cytochrome Reductase specific
for Diphosphopyridine Nucleotide
J.Biol. Chemistry 221 (1956) 277
52. Strittmatter, P. and Velick, S.F.
The Isolation and Properties of Microsomal
Cytochrome
J.Biol. Chemistry 221 (1956) 253
53. Strittmatter, P.
The Reaction Sequence in Electron Transfer
in the Reduced Nicotinamide Adenine Dinucleotide-
Cytochrome b_5 Reductase System
J.Biol. Chemistry 240 (1965) 4486
54. Strittmatter, P.
The Properties of Nucleotide Complexes
with Microsomal Cytochrome Reductase
J. Biol.Chemistry 234 (1959) 2665

55. Taggart, W.V. and Sanadi, D.R.,
Menadiol as an Electron Donor for reversed
oxidative Phosphorylation in submitochondrial
particles
Biochim.Biophys.Acta 267 (1972) 439
56. Takesue, S. and Omura, T.
Solubilization of NADH-cytochrome b_5 Reductase
from Liver Microsomes by Lysosomal Digestion
J.Biochem. 67 (1970) 259
57. Takesue, S. and Omura, T.
Purification and Properties of NADH-cytochrome b_5
Reductase Solubilized by Lysosomes from Rat Liver
Microsomes
J. Biochem. 67 (1970) 267
58. Takesue, S. and Omura, T.
Immunological Similarity between NADH-cytochrome c
Reductases of Mitochondrial Outer Membrane and
Microsomes
Biochem.Biophys.Res.Comm. 40 (1970) 396
59. Thurman, R.G., Ley, H.G. and Scholz, R.
Hepatic Microsomal Ethanol Oxidation
Hydrogen Peroxide Formation and the Role
of Catalase
Eur.J.Biochem. 25 (1972) 420
60. Vanneste, W.H.
Molecular proportion of the fixed cytochrome
components of the respiratory chain of
Keilin-Hartree particles and beef heart
mitochondria
Biochim.Biophys. Acta, 113 (1966) 175
61. Waller, H.D., Löhr, G.W., Zysno, E., Gerok, W.,
Voss, D. und Strauss, G.
Glutathionreduktasemangel mit hämatologischen
und neurologischen Störungen (Autosomal dominant
vererbliche Bildung eines pathologischen Enzyms)
Klinische Wochenschrift, Jg. 43, Heft 8 (1965) 413
62. Weber, H., Weis, W. und Staudinger, H.
Bestimmung des Standardpotentials (pH 7,0)
von cytochrom b_5 (Fe^{++})/Cytochrom b_5 (Fe^{+++})
in mikrosomalen Membranen verschiedener Zustände
Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem. 352 (1971) 109

63. Wills, E.D.
Effects of Vitamin K and naphthoquinones on
lipid peroxide formation and oxidative demethylation
by liver microsomes
Biochem.Pharmacology 21 (1972) 1879
64. Wosilait, W.D. and Nason, A.
Pyridine Nucleotide-Menadione Reductase from
Escherichia Coli
J.Biol. Chemistry 208 (1954) 785
65. Mihara, K. and Sato, R.
Partial Purification of NADH-Cytochrome b_5
Reductase from Rabbit Liver Microsomes with
Detergents and Its Properties
J. Biochem. 71 (1972) 725

8. Lebenslauf

Name: Ingo Georg Bulik

geb.: 7. Februar 1940 in Hindenburg (Oberschlesien)

Schulbildung: Volksschule Niedertaufkirchen 1946-1950
 Oberrealschule Mühldorf/Inn 1950-1955

Berufsausbildung: Lehre als Bankkaufmann 1955-1958
 Bankangestellter 1958-1968

Ziviler Ersatz-
 dienst: Städt. Krankenanstalten
 Nürnberg 1963-1964

2. Bildungsweg: Städt. Abendgymnasium für
 Berufstätige München 1965-1969

Abitur: 11. Juli 1969

Erstimmatrikulation: Universität München
 Medizinische Fakultät WS 1969/70

Vorphysikum: SS 1970

Physikum: WS 1971/72

Studienjahr in England (Universität Manchester) WS 1972/73
 SS 1973

Staatsexamen: SS 1975

